

DESOXYRIBONUKLEINSÄURE (DNA)-SYNTHESE
IN HEPATOZYTEN DES HÜHNEREMBRYOS
UNTER DEM EINFLUSS VON DNA-SYNTHESE-HEMMSTOFFEN
UND RÖNTGENBESTRAHLUNG

Ingo Stammberger

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. K. Tempel

DESOXYRIBONUKLEINSÄURE (DNA)-SYNTHESE
IN HEPATOZYTEN DES HÜHNEREMBRYOS
UNTER DEM EINFLUSS VON DNA-SYNTHESE-HEMMSTOFFEN
UND RÖNTGENBESTRAHLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ingo Stammberger
aus
Rodach bei Coburg

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. K. Tempel
Korreferent: Prof. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	PROBLEMSTELLUNG	8
2.	EINLEITUNG	10
2.1.	Der Hühnerembryo als Versuchsmodell	10
2.2.	Zur Biochemie des Hühnerembryos	11
2.3.	Der Hühnerembryo als Modell der Strahlenbiologie	13
2.4.	Desoxyribonukleinsäure (DNA)- Schädigungen und ihre Reparatur	18
3.	MATERIAL UND METHODIK	24
3.1.	Reagentien	24
3.2.	Tiermaterial	29
3.3.	Versuchsmethoden	29
3.3.1.	Behandlung der Hühnerembryonen	29
3.3.1.1.	In vivo-Röntgenbestrahlung	29
3.3.1.2.	In vitro-Röntgenbestrahlung	30
3.3.1.3.	In vivo-Applikation chemischer Agenzien	31
3.3.2.	Herstellung der Leberzellsuspension	32
3.3.3.	Bestimmung der DNA-Synthese	34
3.3.3.1.	Semikonservative DNA-Synthese (SDS)	34
3.3.3.2.	Unprogrammierte DNA-Synthese (UDS)	36
3.3.4.	Isotopenverdünnungsanalyse	37

3.3.5.	Nukleoidsedimentation	39
3.3.5.1.	Prinzip	39
3.3.5.2.	Ausführung	40
3.3.6.	DNA-Konzentration	41
3.4.	Auswertung der Ergebnisse	41
3.4.1.	Markierungsmethoden	41
3.4.2.	Nukleoidsedimentation	42
3.5.	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	42
4.	ERGEBNISSE	43
4.1.	Versuche zur Methodik	43
4.1.1.	Photometrische Messung der DNA-Konzentration	43
4.1.2.	³ H-Thymidin (H-dT)-Einbau in Abhängigkeit von der Zellkonzentration	44
4.1.3.	³ H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	45
4.1.4.	³ H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der ³ H-dT-Konzentration	46
4.1.5.	³ H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Hydroxyharnstoff(HU)-Konzentration	47
4.1.5.1.	Hydroxyharnstoff in der Vorinkubation	47
4.1.5.2.	Hydroxyharnstoff in der Hauptinkubation	48
4.1.6.	Isotopenverdünnung	49

4.1.7.	Nukleoidsedimentation	51
4.1.7.1.	Einfluß der Zellzahl	51
4.1.7.2.	Einfluß der Lysezeit	52
4.1.7.3.	Einfluß des Gradienten und der Zentrifugationsbedingungen auf die Sedimentationsstrecke	53
4.2.	Festlegung der Versuchsbedingungen	54
4.2.1.	Semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese	54
4.2.2.	Isotopenverdünnungsanalyse	55
4.2.3.	Nukleoidsedimentation	55
4.3.	In vitro-Versuche zur Charakterisierung der Leberzellen	56
4.3.1.	Röntgenbestrahlung	56
4.3.1.1.	Einfluß von Röntgenbestrahlung auf die SDS	56
4.3.1.2.	Einfluß von Röntgenbestrahlung auf die UDS	57
4.3.2.	UV-Licht	58
4.3.2.1.	Einfluß von UV-Licht auf die SDS	58
4.3.2.2.	Einfluß von UV-Licht auf die UDS	59
4.3.3.	Methansulfonsäuremethylester (MMS)	60
4.3.3.1.	Einfluß von MMS auf die SDS	60
4.3.3.2.	Einfluß von MMS auf die UDS	61
4.3.4.	1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC)	62
4.3.4.1.	Einfluß von araC auf die SDS	62
4.3.4.2.	Einfluß von araC auf die röntgenstrahlen-stimulierte UDS	63

4.3.4.3.	Einfluß von araC auf die UV-stimulierte UDS	64
4.3.5.	2',3'-Dideoxythymidin (ddT)	66
4.3.5.1.	Einfluß von ddT auf die SDS	66
4.3.5.2.	Einfluß von ddT auf die röntgenstrahlen- stimulierte UDS	67
4.3.5.3.	Einfluß von ddT auf die UV-stimulierte UDS	68
4.3.6.	3-Aminobenzamid (3-AB)	69
4.3.6.1.	Einfluß von 3-AB auf die SDS	70
4.3.6.2.	Einfluß von 3-AB auf die röntgenstrahlen- stimulierte UDS	71
4.3.6.3.	Einfluß von 3-AB auf die UV-stimulierte UDS	72
4.3.7.	Ethidiumbromid - Einfluß auf die SDS	73
4.3.8.	Novobiocin - Einfluß auf die SDS	74
4.3.9.	Hyperthermie - Einfluß auf die SDS	75
4.4.	Röntgenstrahlenexposition in vivo	76
4.4.1.	Einfluß einer akuten Bestrahlungsdosis auf die semikonservative DNA-Synthese (SDS) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo	76
4.4.1.1.	Einmalige Röntgenstrahlendosis von 8 Gy	76
4.4.1.2.	Einmalige Röntgenstrahlendosis von 4 Gy	77
4.4.1.3.	Einmalige Röntgenstrahlendosis von 1 Gy	78
4.4.1.4.	Einmalige Röntgenstrahlendosis von 0,25 Gy	79
4.4.2.	Einfluß einer akuten Bestrahlungsdosis auf den endogenen Thymidinpool	80
4.4.3.	Einfluß einer akuten Bestrahlungsdosis auf die unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) in Ab- hängigkeit von der Reparaturzeit in vivo	81

4.4.3.1.	UDS nach einer Reparaturzeit von 3 h	81
4.4.3.2.	UDS nach einer Reparaturzeit von 24 h	82
4.4.3.3.	Charakterisierung der UDS	83
4.4.4.	Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung auf die SDS in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo	83
4.4.4.1.	SDS nach einer Reparaturzeit von 3 h	84
4.4.4.2.	SDS nach einer Reparaturzeit von 24 h	85
4.4.5.	Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung auf die UDS in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo	86
4.4.5.1.	UDS nach einer Reparaturzeit von 3 h	86
4.4.5.2.	UDS nach einer Reparaturzeit von 24 h	87
4.5.	In vivo-Einfluß von Agenzien auf die SDS	88
4.5.1.	Methansulfonsäuremethylester (MMS)	88
4.5.2.	1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC)	90
4.6.	Interaktionen in vivo zwischen Hemmstoffen der DNA-Synthese und Röntgenbestrahlung	91
4.6.1.	araC und Röntgenbestrahlung	92
4.6.1.1.	Einfluß auf die SDS	92
4.6.1.2.	Einfluß auf die UDS	93
4.6.1.3.	Charakterisierung der UDS	94
4.6.1.4.	Einfluß auf den endogenen Thymidinpool	95
4.6.2.	ddT und Röntgenbestrahlung Einfluß auf die SDS	96



4.6.3.	3-AB und Röntgenbestrahlung	
	Einfluß auf die SDS	97
4.7.	Nukleoidsedimentation	99
4.7.1.	Einfluß von Röntgenbestrahlung in vitro	99
4.7.2.	Einfluß von Röntgenbestrahlung in vivo	100
5.	DISKUSSION	102
5.1.	In vitro-Versuche zur Charakterisierung der Leberzellen	102
5.2.	Röntgenstrahlenexposition in vivo	107
5.3.	araC-Wirkungen	112
6.	ZUSAMMENFASSUNG	118
	SUMMARY	120
7.	LITERATURVERZEICHNIS	123
	Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-AB	-	3-Aminobenzamid
araC	-	1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin
C/kg	-	Coulomb/kg (Ionendosiseinheit: 1 C/kg = 3876 R)
cpm	-	Impulse/min
d	-	"desoxy"...
/d	-	pro Tag
DE	-	Dosis mit 50%iger Hemmwirkung
⁵⁰ DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dpm	-	Zerfälle/min
ddT	-	2',3'-Dideoxythymidin
dT	-	Thymidin
EB	-	Ethidiumbromid
Gy	-	Gray (1 Gy = 100 rad)
h	-	Stunde
HU	-	Hydroxyharnstoff
LD	-	Dosis mit 50%iger Letalität
⁵⁰ MMS	-	Methansulfonsäuremethylester
NB	-	Novobiocin
PCA	-	Perchlorsäure
R	-	Röntgen (1 R = 2,58 x 10 ⁻⁴ C/kg)
RNA	-	Ribonukleinsäure
SDS	-	Semikonservative DNA-Synthese
T	-	Thymin
UDS	-	Unprogrammierte DNA-Synthese
UV	-	Ultraviolett-Licht

1. PROBLEMSTELLUNG

Nach der Reaktorkatastrophe von Tschernobyl sind die Auswirkungen ionisierender Strahlen auf Mensch und Umwelt vermehrt in den Blickpunkt der Öffentlichkeit gerückt. Dabei zeigte sich einmal mehr, daß zahlreiche strahlenbiologische Fragen, insbesondere zu den Folgen kleiner Strahlendosen, bisher nicht widerspruchsfrei beantwortet werden können.

Im Zusammenhang mit niedrigdosierter (Ganzkörperdosen im Bereich < 10 mSv) Strahlenexposition werden vor allem mutagene, karzinogene und teratogene Effekte diskutiert, deren molekulare Ursachen ganz oder zu einem wesentlichen Teil in Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gesehen werden. Um an einem leicht zugänglichen biologischen Modell sowohl der teratogenen Strahlenwirkung als auch ihrem wahrscheinlichen molekularen Mechanismus Rechnung zu tragen, wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit überwiegend Auswirkungen von Röntgenbestrahlung auf die DNA-Synthese des Hühnerembryos untersucht. Abgesehen davon wurde der Hühnerembryo als strahlenbiologisches Modell gewählt, um Belangen des Tierschutzes entgegenzukommen und dennoch "In vivo - Versuche" zu ermöglichen.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Inwieweit können Parameter des Nukleinsäurestoffwechsels in Geweben des Hühnerembryos als *biochemische Indikatoren* der Einwirkung ionisierender Strahlen herangezogen

werden ?

2. Läßt sich ein *stimulierender Effekt* von Röntgenstrahlen im Sinne einer "Strahlenhormesis" nachweisen ?
3. Wie wirken sich *Hemmstoffe der DNA-Synthese* in Kombination mit Röntgenbestrahlung aus ?

Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich schwerpunktmäßig mit dem Einbau und der Verteilung der mit Tritium markierten DNA-Vorstufe Thymidin in Hepatozyten am 15. Entwicklungstag.

2. EINLEITUNG

2.1. Der Hühnerembryo als Versuchsmodell

(Übersichten siehe unter Ziffer 35,39,49,70 des Literaturverzeichnis.)

Der Hühnerembryo ist seit etwa 100 Jahren als Versuchsmodell bekannt. Die erste Arbeit stammt von *Darvett* (1891), der mit verschiedenen physikalischen Einflüssen, wie beispielsweise Hitze und Kälte, Entwicklungsanomalitäten induzierte (zitiert nach 35).

Während des 20. Jahrhunderts gewannen Teratologie und experimentelle Embryologie immer mehr an Bedeutung, so daß an verschiedenen Wirbeltierarten, darunter auch Vögeln, direkte und indirekte Manipulationen vorgenommen wurden.

Die experimentelle Teratologie entwickelte sich zusehends mit dem Wissen um die Chemoteratogenese. Insbesondere nach der Thalidomid-Tragödie (1962) wurde vermehrt mit Säugtieren gearbeitet, die phylogenetisch mit dem Menschen näher verwandt sind.

Dennoch hat der Hühnerembryo nichts an seiner Bedeutung als Versuchsmodell eingebüßt. So konnte *Kemper* (1962) nach grundlegenden Arbeiten zu pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen an Nichtsäugetieren einen experimentellen Nachweis der teratogenen Wirkung von Thalidomid am bebrüteten Hühnerei erbringen und Hinweise auf einen möglichen Wirkungsmechanismus geben (zitiert nach 49).

Das bebrütete Hühnerei stellt zwar einen Grenzfall zwischen in vitro- und in vivo-System dar, liefert jedoch wertvolle

Grundinformationen zur möglichen Toxizität und Teratogenität verschiedenster Agenzien. In diesem Zusammenhang wird auch auf die Möglichkeit der Kultivierung von Hühnerembryonen in vitro verwiesen (42). Der Versuch am Hühnerembryo ist billig und längstens binnen drei Wochen abzuschließen, so daß mit einer großen Zahl an Stichproben gearbeitet werden kann. Innerhalb kurzer Zeit können so statistisch verlässliche Werte mit hoher Reproduzierbarkeit gewonnen werden. In wesentlichen Teilbereichen der Teratologie ist eine gute Übertragbarkeit auf Säugetiersysteme möglich.

Darüberhinaus wird auch den Belangen des Tierschutzes Rechnung getragen. Nach geltender Anschauung kollidieren Versuche an Hühnerembryonen nicht mit den juristischen und ethischen Aspekten des Tierschutzes. So können - bei Vergleichbarkeit vieler Versuchsergebnisse - die Zahl der Untersuchungen an Säugetieren vermindert und die Zufügung von Schmerzen und Schäden während tierexperimenteller Prüfungen reduziert werden.

2.2. Zur Biochemie des Hühnerembryos

Einen umfassenden Überblick über die Biochemie des Hühnerembryos gibt *Romanoffs* Werk *Biochemistry of the avian embryo* (68).

Da in vorliegender Arbeit ausschließlich Untersuchungen zur DNA-Synthese des Hühnerembryos angestellt wurden, soll im folgenden dieser Aspekt näher erläutert werden.

Berichte über Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes während

der Entwicklung des Hühnerembryos liegen bereits seit längerer Zeit vor. Im Jahre 1948 bestimmten *Novikoff et al.* (57) den DNA- und RNA-Gehalt vom 2. bis zum 20. Tag der Embryonalentwicklung (Abb.2.1.) Daraus geht hervor, daß die DNA-Konzentration am 15.Tag ein Maximum erreicht und danach scharf abfällt.

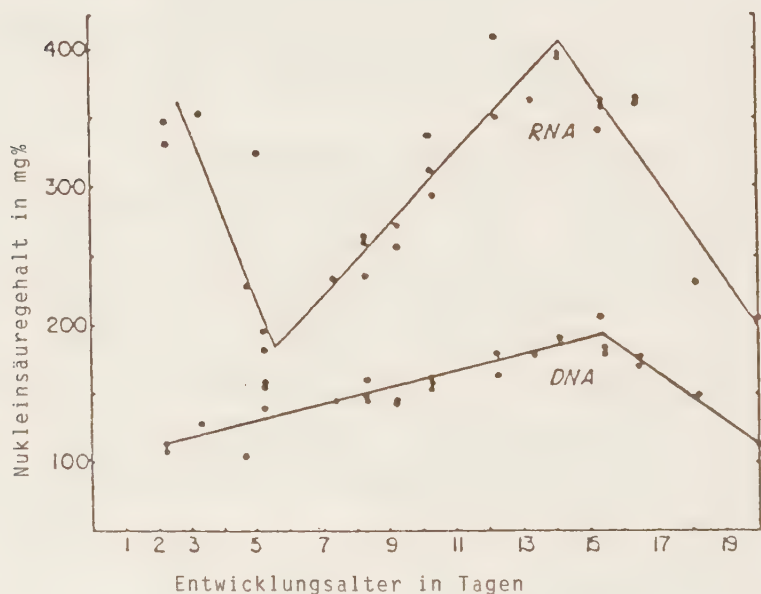


Abb.2.1.: Veränderungen des DNA- und RNA-Gehaltes während der Entwicklung des Hühnerembryos (Trockengewicht, modifiziert nach Novikoff, 1948).

Stevens (79) weist einen DNA-Gipfel am 13. Tag der Embryonalentwicklung nach, ist sich jedoch im Hinblick auf die Ergebnisse von *Novikoff et al.* der Schwierigkeit bewußt, das exakte biologische Inkubationsstadium eines

Hühnereies zu bestimmen. Unterschiede von 1 Tag sind daher kaum signifikant. Gleichzeitig weist Stevens auf die DNA-Umsatzrate zu diesem Zeitpunkt hin. Während dieser Wert bei adulten Kaninchen beispielsweise für die DNA 4 % (für RNA 13 %) innerhalb von 24 h beträgt, zeigt der Hühnerembryo für das gleiche Zeitintervall eine turnover-rate von 116 % (für die RNA 148 %) !

Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der maximalen DNA-Syntheseleistung des Hühnerembryos kamen auch *Caldarera et al.* (5), *Shimabayaski et al.* (72) und *Shrivastaw et al.* (73). Nach *Caldarera et al.* fällt das maximale Konzentrationsniveau der DNA, das er für den 14. Tag der Embryonalentwicklung bestimmte, zusammen mit dem Zeitpunkt, zu dem auch das morphologisch typische Bild der Adultform der Leber erscheint.

2.3. Der Hühnerembryo als Modell der Strahlenbiologie

Verglichen mit anderen Spezies, insbesondere Ratten und Mäusen, liegen relativ wenig Ergebnisse über die Auswirkungen ionisierender Strahlen auf den Hühnerembryo vor.

1964 bestimmte Clapp (7) die LD₅₀ 24 h nach steigenden Bestrahlungsdosen für die Entwicklungsstadien 2. - 19. Tag (Abb. 2.3.1.). Am strahlenempfindlichsten sind nach seinen Ergebnissen Embryonen am 7. und 8. sowie am 16.- 18. Tag der Inkubation. Als mittlere LD_{50(24h)} vom 3. - 19. Tag der Bebrütung ergab sich ein Wert von 0,213 C/kg.

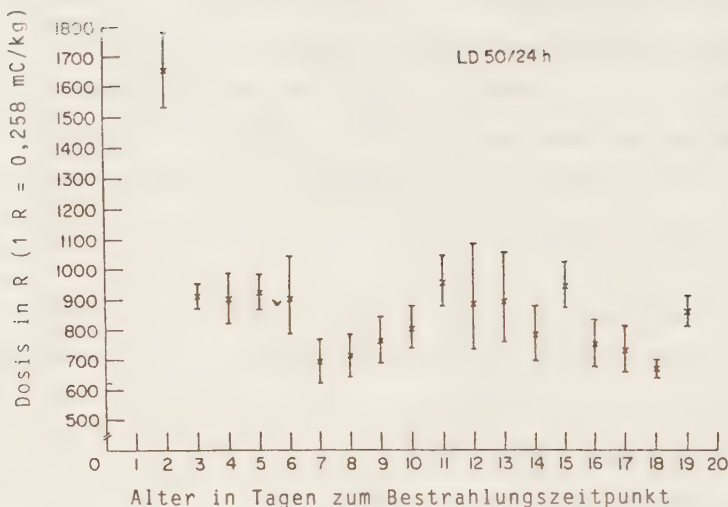
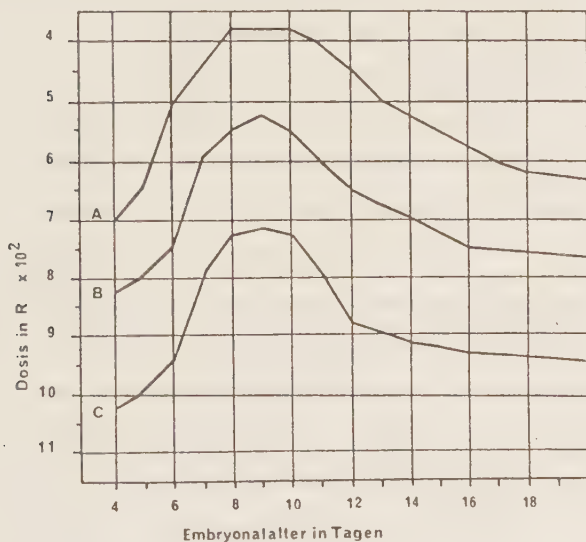


Abb.2.3.1.: Bestimmung der LD₅₀ 24 h nach Röntgenbestrahlung (modifiziert nach Clapp, 1964).

Eine weitere Arbeit über die Strahlenempfindlichkeit des Hühnerembryos im Laufe seiner 21tägigen Entwicklung stammt von Wendt (91). Auch er stellte ein Maximum der Strahlenempfindlichkeit für den 7. bis 11. Bebrütungstag fest (Abb. 2.3.2.). Dagegen führen erst relativ hohe Röntgenstrahledosen beim 1 - 3 Tage alten Hühnerembryo zu unspezifischen Fehlbildungen an denjenigen Organen, die sich zur Zeit der Bestrahlung gerade in einer phänokritischen Phase befinden. Bei älteren Embryonen (4.- 20. Tag) treten als Bestrahlungsfolgen vermehrt biochemische Veränderungen auf. Verschiedene Faktoren, wie Eigröße, Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Inkubation, können die Empfindlichkeit des Hühnerembryos nur geringfügig modifizieren. Im

Einzelfall sind Abweichungen der Wirkungs-dosis um etwa 5 % von den in Abb. 2.3.2. angegebenen Werten möglich.



$$1 \text{ R} = 2,58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$$

Abb.2.3.2.: Die Strahlenempfindlichkeit 4 bis 20 Tage alter Hühnerembryonen. Kurve A: Maximal zulässige Strahlendosen, die von allen Embryonen überlebt werden (maximale Subletaldosis). Kurve B: Strahlendosen, die 50 % der Embryonen innerhalb von 24 h töten (LD 50/24 h). Kurve C: Untere Grenze des absolut letalen Dosisbereichs (LD 100/24 h). (aus: Wendt, E.: Über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Hühnerembryonen, Arch. Geflügelk. 45, S. 89, 1981.)

In einer neueren Arbeit untersuchten Phillips und Coggle (63) ebenfalls die Strahlenreaktion des Hühnerembryos. Sie beobachteten die größte Strahlenempfindlichkeit am 10. bis 11. Entwicklungstag. Die LD₅₀ für dieses Stadium bestimmten die Autoren mit 6,72 Gy, was sich kaum von den Ergebnissen Wendts unterscheidet.

In diesem Zusammenhang taucht die Frage nach dem Mechanismus des Strahlentodes des Hühnerembryos auf, der sich grundsätzlich von dem des Säugers zu unterscheiden scheint.

Zöller (99) konnte nach der Bestrahlung 4 - 6 Tage alter Hühnerembryonen mit einer Dosis von 0,3096 C/kg innerhalb einer Minute unter Ausschluß intrazellulärer Wirkungen nachweisen, daß toxische Strahlenfolgeprodukte ursächlich sind. Diese *Radiotoxine* sollen im Blut entstehen und zum Kreislauftod führen. Stearner und Sanderson (77) dagegen kamen zu einem anderen Ergebnis, allerdings an 3 Wochen alten Küken, die sie u. a. mit einer Dosis von 0,3096 C/kg innerhalb von 15 Minuten bestrahlten (Mortalität > 70 %). Sie wiesen nach, daß sich der letale Strahlenschaden im Zelluntergang des vaskulären Systems äußerte.

Andere Untersuchungen beschäftigten sich dagegen mit der Frage positiver Auswirkungen - vorallem niedriger - Strahlendosen auf Entwicklung und Schlupfergebnis von Hühnerbruteiern. So sollen Gamma-Strahlendosen von 0,258 - 2,58 mC/kg vor und bis zum 7. Tag der Bebrütung einen deutlichen Anstieg von Wachstum und Entwicklung der Hühnerembryonen haben und das Schlupfergebnis steigern (44). Andere Ergebnisse (56) stellen dies jedoch wieder infrage. Insbesondere russische Autoren beschrieben stimulierende Effekte niedriger Strahlendosen auf biochemische Vorgänge des Hühnerembryos. So soll eine Dosis bis zu 0,03 Gy neben einer Stabilisierung mitochondrialer Strukturen den Enzym-Substrat-Umsatz in Leberzellen vermindern (86).

Gamma-Bestrahlung (0,0097 - 0,097 Gy) vor der Bebrütung der Eier führte zu einem Anstieg des DNA-Gehaltes sowie zu erhöhter Mitoserate im Hypophysenvorderlappen (40). Auch die Schilddrüse des Hühnerembryos soll bei Strahlendosen von 0,774 - 12,9 mC/kg positive Veränderungen erfahren. In den Untersuchungen von *Tuichijev et al.* (88) beispielsweise stieg der Gehalt an DNA und Zellproteinen an, das Gewicht des Organs nahm zu, und die Fähigkeit, das Isotop ¹³¹J zu absorbieren, wurde erhöht.

Auch in der postnatalen Entwicklung der Küken läßt Röntgenbestrahlung (12,9 mC/kg) während der Embryogenese den DNA- und RNA-Gehalt von Leber, Milz und Muskulatur ansteigen, ohne jedoch die Nukleotidzusammensetzung (Purin-Pyrimidin-Verhältnis) zu ändern (85).

Ganz anders dagegen verhält es sich bei Einwirkung höherer Strahlendosen. Auch wenn eine Dosis von 0,129 C/kg auf den 11 Tage alten Embryo keinen wesentlichen Unterschied in Gewicht und Wachstum gegenüber unbestrahlten Kontrollen bewirkte, so war doch 0,5 bis 40 h nach Bestrahlung ein signifikanter Abfall des DNA- und RNA-Gehaltes feststellbar (53). Andere Autoren (46) geben den Abfall der DNA-Basen Adenin, Guanin und Thymin 5 Tage nach einer Bestrahlung des 14 Tage alten Hühnerembryos mit 0,1032 C/kg sogar mit ca. 50 % an. Ähnliche Untersuchungen stammen von *Todorov* (87), *Jovanovic* (36) und *Dryanovski* (17). Sie beobachteten übereinstimmend bei Strahlendosen von 8 bzw. 10 Gy, insbesondere am 12. bis 14. Tag der Embryonalent-

wicklung, eine Abnahme des Nukleotidgehaltes in der Leber des Hühnerembryos.

2.4. DNA-Schädigungen und ihre Reparatur

Zum besseren Verständnis soll zunächst ein kurzer Überblick über die möglichen Schädigungen an der DNA sowie die unmittelbar daraus resultierenden Reparaturvorgänge gegeben werden (Übersichten siehe unter Ziffer 8,11,12,21,29,37,45 und 76 des Literaturverzeichnisses).

Tab.2.4.1. Beispiele für Schädigungen der DNA (modifiziert nach Spath, 1985):

Basenschäden	
Dimere vom Cyclobutantyp	UV-Strahlen
Addukte	UV-Strahlen
Hydrate	UV-Strahlen
Alkylierung	alkylierende Agenzien z.B. MMS
Depurinierung	alkylierende Agenzien, spontane Hydrolyse
Strangbrüche	
Einzelstrangbrüche	ionisierende Strahlen
Doppelstrangbrüche	ionisierende Strahlen
Crosslinks	
Verknüpfungen zwischen Nukleinsäuren	chemische Agenzien
Verknüpfungen zwischen Nukleinsäuren und Protein	chemischen Agenzien, UV-Strahlen
Interkalation	interkalierende Agenzien z.B. Ethidiumbromid

Diesen Schädigungen setzt die Zelle in beschränktem Umfang endogene Reparaturmechanismen entgegen. Einen Überblick über bisher bekannte Reparaturmechanismen gibt Tab. 2.4.2.:

PRÄREPLIKATIVE REPARATUR
1. <u>Photoreaktivierung</u>
2. <u>Dunkelreparatur</u>
2.1. Strangbruchreparatur
2.2. Basenexcision
2.3. Nucleotidexcision
-Kurzkettenexcision (etwa 30 bis 100 Nucleotide)
- ionisierende Strahlen
-Langkettencision (etwa 1500 Nucleotide)
- UV-Licht
2.4. Dealkylierung von DNA-Basen (z.B. O ⁶ -Methylguanin)
POSTREPLIKATIVE REPARATUR
1. <u>Rekombinationsreparatur</u>
2. <u>SOS-Reparatur</u>
3. <u>Plasmidkontrollierte Reparatur</u>

Tab. 2.4.2.: Reparaturmechanismen an der DNA (aus: Spath, A.: Semikonservative und unprogrammierte (reparaturbedingte) Desoxyribonukleinsäuresynthese in Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte unter dem Einfluß von Diäthylthiocarbamat (DDC), Diss.med.vet. München 1985, S.7)

Da in vorliegender Arbeit insbesondere UV-Licht und ionisierende Strahlen eingesetzt wurden, soll auf die von diesen Noxen induzierte Excisionsreparatur näher eingegangen werden.

Nukleotidexcision

Bei der Nukleotidexcision, der bisher am intensivsten untersuchten Reparaturform, wird ein kurzer oder längerer Strang benachbarter Nukleotide aus der DNA herausgeschnitten. Man unterscheidet eine fehlerfrei arbeitende *Kurzstrangexcision* und eine mit Fehlern behaftete *Langstrangexcision*.

Kurzstrangexcision

Die Kurzstrangexcision tritt vorwiegend nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf und läuft unter dem Zusammenwirken verschiedener Reparaturenzyme ab. Zunächst erfolgt eine Incision in der Nähe der geschädigten Stelle, katalysiert von *Endonucleasen*, welche die Phosphordiesterbrücke an der 5'-Glycosylbindung hydrolysieren. Durch die Aktivität der *Endonucleasen* ist ein freies Strangende entstanden, das den Ansatzpunkt für *Exonucleasen* bildet, die ein DNA-Strangstück einschließlich der geschädigten Stelle herausschneiden. Der intakte Komplementärstrang dient *Polymerasen* als Schablone für die Neusynthese des herausgeschnittenen Abschnittes der DNA. *Ligasen* beenden den Reparaturvorgang, indem sie die neusynthetisierten Kettenstücke einfügen und deren Enden mit den intakten Abschnitten des DNA-Stranges verbinden. Dieser Reparaturmechanismus arbeitet außerordentlich rasch (Halbwertszeit im Bereich von Minuten) und aufgrund ständiger Korrektur möglicher Fehleinbauten mit großer Exaktheit.

Langkettenexcision

Die Langkettenexcision, die z.B. durch UV-Licht induziert wird, arbeitet im Gegensatz zur Kurzkettenreparatur nicht fehlerfrei. Es wird vermutet, daß eine Langkettenexcision dann abläuft, wenn beide DNA-Stränge relativ nahe beieinander geschädigt wurden. Im Prinzip verläuft diese Reparaturform wie die Kurzkettenexcision, jedoch werden wesentlich längere DNA-Abschnitte herausgeschnitten. Daneben wird die Kurzstrangreparatur mit der Aktivität der *DNA-Polymerase β* in Verbindung gebracht, während die Langkettenreparatur offenbar mehr von der *Polymerase α* abhängt.

Fehler können u.a. dann auftreten, wenn Abbau und Polymerisation des einen Stranges die Schadstelle des zweiten Stranges überschreiten. Da an dieser Stelle kein intakter DNA-Abschnitt mit Matrizenfunktion für die entsprechende Neusynthese des gegenüberliegenden Stranges vorhanden ist, kann es zum Einbau falscher Nukleotide kommen.

Hemmung der DNA-Synthese

Die *semikonservative DNA-Synthese* macht den Hauptanteil der gesamten DNA-Syntheseleistung der Zelle aus, die reparaturbedingte *unprogrammierte DNA-Synthese* dagegen weniger als 5 %. Da die Polymerase α sowohl an der SDS als auch an der UDS (Langkettenexcision) beteiligt ist, wird ihr ein Anteil von etwa 80 - 90 % an der gesamten DNA-Synthese zugeschrieben. Die Polymerase β dagegen soll hauptsächlich bei der Kurzstrangexcision eine Rolle spielen.

Collins et al. (11) berichten, daß beide Polymerasen ein-
 ander ersetzen können, sobald eine von beiden gehemmt wird.
 Die in vorliegender Arbeit eingesetzten Hemmstoffe entfalten
 ihre Wirkung in erster Linie an den Enzymen der DNA-Syn-
 these. Ihr Wirkungsmechanismus wird bei den jeweiligen in
 vitro-Versuchen beschrieben. Eine umfassende Übersicht über
 Reparatursysteme und deren Hemmstoffe geben Collins et al.
 (11) in *DNA repair and its inhibition*, dem Abb. 2.4.3. ent-
 nommen ist:

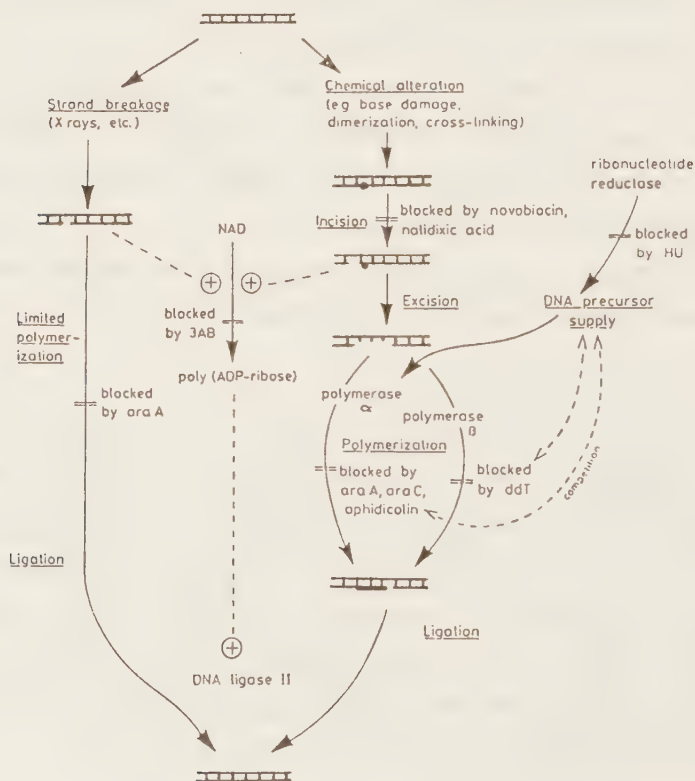


Abb.2.4.3.: Reparaturgeschehen und dessen Hemmung durch verschiedene Agenzien. Unterbrochene Linien zeigen Interaktionen an (Aktivierung +, oder Hemmung). Aus: Collins,A. et al.: DNA-Repair and its Inhibition, Oxford 1984, S. 2.

In den folgenden Versuchen wurde nach orientierenden Voranalysen zunächst in vitro die semikonservative DNA-Synthese der Hepatozyten des Hühnerembryos charakterisiert. Dazu dienten vor allem Hemmstoffe der DNA-Synthese, deren Wirkungsmechanismus z. T. aus Abb. 2.4.3. ersichtlich ist und zudem bei den einzelnen Versuchen beschrieben wird.

In weiteren Untersuchungen wurde die Wirkung von Röntgenbestrahlung in vivo getestet. Abschließend wurde versucht, über die Interaktion von Hemmstoffen der DNA-Synthese und Röntgenbestrahlung in vivo die, wie sich herausstellen sollte, bemerkenswerte *Strahlenresistenz* der DNA-Synthese des Hühnerembryos auf ihre mögliche Ursache hin zu untersuchen.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien

3-Aminobenzamid (3-AB)

Sigma A 0788

1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC)

Sigma C 1768

Bisbenzimid

Calbiochem GmbH H 33258

Collagenase

Typ IV, zur Hepatozytenisolierung, Sigma C 5138

Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Na-Salz der DNA aus Kälberthymus

EGA-Chemie 16,820-3

2'-Desoxythymidin (dT)

Serva 18600

2',3'-Dideoxythymidin (ddT)

Sigma D 1138

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat

Merck 6580

Ethylendiamintetraessigsäure-Na-Salz (EDTA)

Serva 11280

Ethidiumbromid (EB)

2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiniumbromid

Serva 21238

D(+)-Glucose (Monohydrat)

Merck 8342

Hanks-Lösung (Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺-frei)

1 l wäßrige Lösung enthält:

Natriumchlorid 136,9 mMol

Dinatriumhydrogenphosphat 0,33 mMol

Kaliumchlorid 5,36 mMol

Kaliumdihydrogenphosphat 0,36 mMol

Glucose 5,55 mMol

Zu 1 Liter dieser Lösung werden 25 ml einer wäßrigen Natriumhydrogenkarbonat-Lösung (167 mMol/l) gegeben und die gesamte Lösung mit Salzsäure (1 mMol/l) auf pH = 7,4 eingestellt.

Hydroxyharnstoff (HU)

Sigma H 8627

Kaliumchlorid

Merck 4936

Kaliumdihydrogenphosphat

Merck 4871

Lyiselösung für die Nukleoidsedimentation

1 l wäßrige Lösung enthält:

Natriumchlorid 1,5 mMol

EDTA 0,1 Mol

Triton X-100 0,7 % (V/V)

Einstellung auf pH = 8,0 mit Natriumhydroxid (1 Mol/l)

Methansulfonsäuremethylester (MMS)

Merck-Schuchardt 820775

3

H-Methylthymidin, sterile wäßrige Lösung

50-80 Ci/mMol (1,85-2,96 TBq/mMol), New England Nuclear

NET-027Z

Natriumchlorid

Merck 6404

Natriumhydrogencarbonat

Merck 6329 E

Natronlauge, hergestellt aus Titrisol^R

400 g NaOH für 1 l Natronlauge (1Mol/l), Merck 9959

Novobiocin (NB), Natrium-Salz

Sigma N 1628

Perchlorsäure, 70 %

Merck 519

Quickszint 402

Toluol/Triton X-100-Szintillator zur

Messung wäßriger Proben, Zinsser 1663200

Saccharose, zur Dichtegradientenzentrifugation

Merck 7654

Salzsäure, hergestellt aus Titrisol^R

36,461 g Salzsäure pro 1 l (1 Mol/l), Merck 9973

Salzsäure, rauchend 37 %

Merck 317

Stammlösung für den Saccharosegradienten

zur Nukleoidsedimentation

1 l wäßrige Lösung enthält:

Natriumchlorid 1,5 Mol

Trispuffer 0,02 Mol

EDTA 1 mMol

Bisbenzimid 1 mg/ml

Aus dieser Lösung wird eine 15- bzw. 30 %ige (G/G)

Saccharoselösung hergestellt, Einstellung mit rauchender

Salzsäure auf pH = 8,0.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan,

Puffersubstanz, Merck 8382

Triton X-100,

nichtionisches Detergens, Octylphenol-polyethylenglykolether

Serva 37240

Trypanblau

Merck 11732.

3.2. Tiermaterial

Für die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung wurden 15 Tage alte Hühnerembryonen verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die DNA-Syntheseleistung am größten ist (57); das Alter wurde vom Tag der Einlage der Hühnereier in den Brutschrank an gerechnet. Dabei handelte es sich um Eier der Rasse Weiße Leghorn vom Gut Heinrichsruh, Langenbach/Obb..

Die Bebrütung erfolgte in einem Kleinmotorbrüter der Fa. Ehret (Typ KMB 2) mit automatischer Wendung alle 4 Stunden bei einer Temperatur von 37,8 °C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 60 %.

3.3. Versuchsmethoden

Als Versuchsmaterial dienten kernhaltige Zellen aus der Leber der Hühnerembryonen. Bei den einzelnen Versuchen wurden jeweils zwischen 2 und 8 Hühnerembryonen den gleichen Agenzien ausgesetzt (Röntgenstrahlen, chemische Substanzen) und deren Lebern gepoolt. Es wurden ausschließlich lebende Hühnerembryonen verwendet, während der Bebrütung abgestorbene nach Schieren ausgesondert.

3.3.1. Behandlung der Hühnerembryonen

3.3.1.1. In vivo-Röntgenbestrahlung

Die Exposition der bebrüteten Eier erfolgte als Ganzzeirröntgenbestrahlung mit dem Kristalloflex 710 H der Fa. Siemens AG (Scheitelspannung 55 kV, Röhrenstrom ≤ 30 mA,

Halbwertschicht 0,16 mm Cu, Filterung mit 0,16 mm Cu). Der Fokus-Eiabstand betrug bei jedem Versuchstyp 30 cm (Oberflächendosisleistung je nach erforderlicher Dosis 0,25 - 0,40 Gy/min).

Es wurden jeweils bis zu 4 Eier gleichzeitig mit dem stumpfen Pol nach oben bestrahlt. Versuchsmessungen mit dem Fingerhutdosimeter (Kleinkammer Siemens Egdiv 891 a) in einem hartgekochten Hühnerei ergaben, daß noch rund 67 % der Oberflächendosis im Dotter nachweisbar waren.

Die Kontrollembryonen wurden analog einer gleichlangen Scheinbestrahlung unterzogen wie die röntgenbestrahlten Embryonen.

Diese in vivo-Bestrahlungen erfolgten entweder einmalig akut mit Dosen von 0,25 - 8 Gy oder fraktioniert mit je einer Fraktion (jeweils 8.30 Uhr) an vier aufeinanderfolgenden Tagen in Dosen von 0,5 - 2 Gy je Fraktion.

3.3.1.2. In vitro-Röntgenbestrahlung

Diese erfolgte analog der in vivo-Bestrahlung. Mit je 1 ml Zellsuspension gefüllte Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden in eine mit Eis gefüllte Petrischale gelegt und bei einem Focus-Zellabstand von 14 cm mit einer Dosisleistung von 1,75 Gy/min bestrahlt. Die maximale Dosis der Akutbestrahlung lag bei 56 Gy (5600 rd).

Während dieser Zeit wurden die Kontrollen im Dunklen auf Eis gehalten.

3.3.1.3. In vivo-Applikation chemischer Agenzien

Soweit die Wirkung bestimmter Substanzen auf den Hühnerembryo in vivo untersucht werden sollte, wurden die Agenzien entsprechend den gewünschten Konzentrationen in 100 µl Hanks-Medium gelöst.

Ausgehend von den Ergebnissen der in vitro-Versuche, bei denen die Konzentrationen auf 1 ml bezogen wurden, ging man bei den in ovo-Injektionen von einem durchschnittlichen Eivolumen von 40 ml aus.

Die Injektion der Substanzen erfolgte über die Luftkammer auf die innere Schalenhaut (23). Dazu wurden die Eischalen direkt über der Luftkammer gefenstert und 100 µl der gelösten Substanz mit einer Pipette zugegeben. Kontroll-embryonen erhielten einen Zusatz von 100 µl substanzfreier Hanks-Lösung. Das Eischalenfenster wurde mit einem Klebebandstreifen verschlossen, die Eier wurden bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung im Brutschrank weiterinkubiert.

Bei der Untersuchung der DNA-Synthese nach in vivo-Applikation von Substanzen in Kombination mit in vivo-Bestrahlung wurde nach der Injektion in ovo analog 3.3.1.1. vorgegangen. Die in vivo-Bestrahlung erfolgte 3 Stunden nach der in ovo-Injektion, da davon auszugehen war, daß zu diesem Zeitpunkt die Agenzien in pharmakologisch wirksamer Konzentration in den Leberzellen enthalten waren (23,27).

3.3.2. Herstellung der Leberzellsuspension

Der lebende Hühnerembryo wurde dem Ei entnommen und decapitiert. Nach Eröffnung des Bauch-/Brustraumes wurde die Leber entblutet, um die kern- und damit DNA-haltigen Erythrozyten zu entfernen.

Dazu wurden 10 ml eisgekühlte Hanks-Lösung mit einer Spritze vorsichtig in das Herz injiziert und so die Leber über das Herz perfundiert, bis sich die Farbe der Leber mit zunehmender Entblutung von dunkelrotbraun nach hellolivgrün änderte. Es folgte eine Injektion von 5 ml kalter Hanks-Lösung in situ in beide Leberlappen sowie nach der Entnahme der Leber nochmals eine Perfusion und Abspülung des isolierten Organes in einer Petrischale. Um eine ausreichende Ausbeute an Hepatozyten zu gewährleisten, wurden die Lebern von jeweils zwei bis acht Hühnerembryonen, die den gleichen in vivo-/in vitro-Testbedingungen ausgesetzt worden waren bzw. werden sollten, gepoolt.

Das so gewonnene Lebergewebe wurde auf einem eisgekühlten Uhrglas in Hanks-Lösung gesammelt, mit einer Schere feingeschnitten und in einem verschließbaren Gläschen in 5 ml Collagenase-Hanks-Lösung bei 37 °C im Wasserbad 20 Minuten lang unter leichter Bewegung aufgeschlossen. Die Endkonzentration der Collagenase betrug dabei 0,1 % in Hanks-Lösung.

Zur Verbesserung des Zellaufschlusses wurde die Suspension mehrmals von Hand geschüttelt und mit einer Pipette gut durchmischt.

Nach dieser Inkubation wurde die Zellsuspension durch Nylonstrumpfgewebe in ein Zentrifugenglas filtriert, mit eiskühler Hanks-Lösung aufgefüllt und 5 min lang bei 4 °C und 600 x g zentrifugiert (Zentrifuge : Christ, Osterode/Harz, Typ UJ 2). Der collagenasehaltige Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 10 ml eiskühler Hanks-Lösung resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Dieser Arbeitsgang diente zur Auswaschung noch verbliebener Collagenase. Das so gewonnene Pellet wurde in 1 ml eiskühler Hanks-Lösung resuspendiert (Ausgangszellsuspension).

Die durchschnittliche Ausbeute an Leberzellen betrug 8×10^6 je Hühnerembryo.

Analysen, die eine Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese erforderten, wurden von Versuchsbeginn an mit einem Hydroxyharnstoffzusatz von 0,1 Mol/l zur Ca- und Mg-Ionenfreien Hanks-Lösung durchgeführt.

Die Zellkonzentration wurde durch Auszählen in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal ermittelt. Da die intakte Zellmembran für Trypanblau impermeabel ist, wurden gleichzeitig zur Überprüfung der Zellvitalität 100 µl Zellsuspension mit 10 µl einer 1,8 %igen Trypanblaulösung vermischt. Ausgewertet wurden nur Zellen, die keine Anzeichen des Zellunterganges erkennen ließen. Die erforderliche Zelldichte wurde durch Verdünnen der Ausgangssuspension mit Hanks- (SDS) bzw. HU-haltiger Hanks-Lösung (UDS) hergestellt.

3.3.3. Bestimmung der DNA-Synthese

Die semikonservative und unprogrammierte Desoxyribonukleinsäuresynthese (SDS bzw. UDS) wurden in vitro über den Einbau der radioaktiv markierten DNA-Vorstufe ³H-Thymidin in die säurefällbare, hydrolysierbare Zellfraktion bestimmt.

3.3.3.1. Semikonservative DNA-Synthese (SDS)

Die auf eine Zellkonzentration von $2,0 \times 10^6$ /ml eingestellte Zellsuspension wurde entsprechend der vorgesehenen Anzahl an Einzelansätzen zu je 1 ml in Reaktionsgefäße (Eppendorf 3812) pipettiert und anschließend 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Wasserbad (Kottermann Gfl, Typ 1083) vorinkubiert. Soweit die in vitro-Wirkung bestimmter Substanzen untersucht werden sollte, wurden die Agenzien den Einzelansätzen in der erforderlichen Konzentration, in 100 µl Hanksmedium gelöst, zugesetzt. Die Kontrollansätze erhielten einen Zusatz von 100 µl substanzfreier Hanks-Lösung.

Nach Abschluß der Vorinkubation wurden die Ansätze 8 s bei $9.980 \times g$ (Eppendorf-Zentrifuge 5412) zentrifugiert und das erhaltene Zellsediment in 1,75 ml Hanks-Lösung resuspendiert.

Bei Versuchen zur Hyperthermie wurde die Temperatur während der Vorinkubation auf $43 \pm 0,5$ °C erhöht. Wurden Substanzen in ovo appliziert, entfiel die Vorinkubation.

Nach Aufteilen der Einzelansätze auf jeweils 3 Parallel-

proben zu 0,5 ml wurden den Zellsuspensionen je 50 μ l 3 H-Thymidin (1,25 μ Ci bzw. 46,25 kBq) zugesetzt.

Anschließend erfolgte die Hauptinkubation (90 min bei 37 °C).

In einigen Versuchen wurde auch die Wirkung bestimmter Substanzen in der Hauptinkubation getestet. In diesem Fall wurden die Verbindungen, in der gewünschten Konzentration in 100 μ l Hanks-Medium gelöst, jeweils den Parallelproben zugesetzt. Die Kontrollansätze erhielten einen Zusatz von 100 μ l substanzfreier Hanks-Lösung.

Intrazelluläre Aufnahme und Einbau von 3 H-dT wurden durch Fällung mit 1 ml kalter Perchlorsäure (1,5 Mol/l) beendet. Anschließend wurden die Ansätze 10 min lang bei -15°C im Eisfach gelagert. Zur Ermittlung der unspezifischen 3 H-dT-Bindung wurden Kontrollproben unmittelbar nach Zusatz

von 3 H-dT gefällt und bis zur weiteren Aufarbeitung im Eisfach gehalten. Nach der Kühlagerung wurden alle Ansätze 5 min bei 6.500 x g zentrifugiert (Heraeus-Christ - Zentrifuge, Typ 1240) und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Sediment wurde dreimal mit 2 ml Perchlorsäure (1 Mol/l) gewaschen.

Zur Solubilisierung des DNA-haltigen Sediments wurden den Proben 2 ml Perchlorsäure (1 Mol/l) zugesetzt. Während 20minütigem Erhitzen bei 90 °C im Wasserbad erfolgte die hydrolytische Spaltung der DNA in säurelösliche Bruchstücke und einzelne Nukleotide. Nach anschließender Kühlung für 20 min bei -15°C im Eisfach und erneuter Zentrifugation

(10 min bei 6.500 x g, Heraeus-Christ, Typ 1240) wurde das Hydrolysat als Überstand zur Messung der Radioaktivität und des Nukleinsäuregehaltes gewonnen.

Zur Ermittlung der ^3H -dT-Aktivität wurden 0,5 ml des Hydrolysates mit 3 ml Flüssigszintillator Quickszint 402 in Polypropylen-Zählhülsen (Zinsser Minivials 3000882) vermischt. Die Impulsrate wurde in einem Flüssigszintillationszähler (Kontron MR 300, Meßdauer 5 min) gemessen.

3.3.3.2. Unprogrammierte DNA-Synthese (UDS)

Da die reparaturbedingte, unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) nur in geringem Umfang an der Gesamt-DNA-Syntheseleistung der Zelle beteiligt ist, ist es notwendig, zur Untersuchung des Reparaturanteils die replikative Synthese möglichst quantitativ zu hemmen. Die DNA-Replikation kann durch Hydroxyharnstoff über eine Blockade des Ribonucleotid-Diphosphat-Reduktase-Systems gehemmt werden, ohne die Reparaturkapazität der Zelle wesentlich zu beeinträchtigen. Die UDS wurde zusätzlich durch UV-Bestrahlung, die in erster Linie eine Langkettenreparatur bewirkt, stimuliert.

Bei Versuchen zur UDS wurde dem Inkubationsmedium (Hanks-Lösung) 0,1 Mol/l Hydroxyharnstoff zugesetzt. Ansonsten erfolgte die Verarbeitung wie unter 3.3.3.1. beschrieben, jedoch wurden zur Hauptinkubation 100 μl ^3H -dT mit einer Aktivität von 5 μCi (185 kBq) zugesetzt.

Bei der Messung der UDS nach UV-Bestrahlung wurden die Zellsuspensionen im Anschluß an die Vorinkubation in sehr

dünner Schicht ($0,045 \text{ ml/cm}^2$) auf eisgekühlten Petrischalen mit einer UV-Lampe (Philips TUV 30 Maximalemission bei 254 nm, Fluenz $4 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Bei jedem UDS-Ansatz wurde eine unbestrahlte Kontrolle den gleichen Versuchsbedingungen unterzogen.

Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, wobei die Petrischalen mit 1 ml HU-Hanks-Lösung nachgespült wurden. Die Ansätze wurden 8 s abgeschleudert ($9980 \times g$), das Zellsediment in 1,75 ml HU-Hanks-Lösung resuspendiert und anschließend wie unter 3.3.3.1. beschrieben weiter verarbeitet.

3.3.4. Isotopenverdünnungsanalyse

Anhand einer Isotopenverdünnungsanalyse (76) sollten Rückschlüsse auf das Verhalten des endogenen Thymidinpools gezogen werden. Unterschiedliche Größen des Thymidinpools der Zellen verdünnen gleichbleibende Konzentrationen zugesetzten Tracers unterschiedlich stark. Dementsprechend ändert sich die ^3H -dT-Einbaurate, obwohl die Gesamt-DNA-Syntheseleistung unverändert sein kann.

Über Veränderung der endogenen Poolgrößen kann eine Substanz somit eine unterschiedliche ^3H -dT-Einbaurate bewirken, ohne die replikative oder unprogrammierte DNA-Syntheseleistung zu beeinflussen.

Die exogene Zugabe unmarkierten Thymidins zum Inkubationsmedium führt zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären Verdünnung der markierten DNA-Vorstufe und somit

zu verminderten ³H-dT-Einbauraten. Sind die endogenen Poolgrößen bei Zufuhr unmarkierten Thymidins bereits verändert, müßte sich dies in einer bei Kontrollansätzen und behandelten Proben unterschiedlichen Hemmung des ³H-dT-Einbaues ausdrücken: Bei einem expandierten Pool bewirkt der Zusatz einer bestimmten Menge unmarkierten Thymidins eine geringere Verdünnung des Tracers als bei einem verkleinerten Thymidinpool. Dies bedeutet, daß zur Erzielung der gleichen ³H-dT-Einbauhemmung bei Expansion des endogenen Pools mehr, bei Kontraktion des Pools dagegen weniger unmarkiertes Thymidin zugesetzt werden muß. Anders ausgedrückt: Beruht eine durch Behandlung von Zellen ausgelöste Änderung des Thymidineinbaues ausschließlich auf Veränderung der endogenen dT-Pool-Größe, ist der beobachtete Effekt seinem Umfang nach durch Zusatz exogenen (unmarkierten) dT zu beeinflussen. Liegt ein solcher Einfluß nicht vor, wird im allgemeinen davon ausgegangen, daß Änderungen des endogenen dT-Pools nicht zur Erklärung des veränderten Tracereinbaues herangezogen werden können.

Nach Zusatz steigender Molaritäten unmarkierten Thymidins in 100 µl Hanks-Lösung wurden die Leberzellen 30 min vorinkubiert. Der Kontrollfraktion wurden 100 µl dT-freier Hanks-Lösung zugesetzt (keine Beeinflussung des Tritium-dT-Einbaues). Zentrifugation und Mediumwechsel führten im weiteren Verlauf zu den unter 3.3.3.1. beschriebenen Schritten.

3.3.5. Nukleoidsedimentation

3.3.5.1. Prinzip

Die Sedimentation von Nukleoiden gilt als sensibles Nachweisverfahren zur Erkennung struktureller DNA-Veränderungen (92,93).

Das Prinzip der Methode beruht auf der spezifischen Sedimentationskonstanten unterschiedlich dichter "Teilchen" in einem Dichtegradienten. Derartige Partikel, Nukleioide genannt, entstehen bei vorsichtiger Lyse von Zellen mit einem nichtionischen Detergens bei hoher Salzkonzentration. Nukleioide sind Zellkernpartikel, die v.a. aus Zellkern-DNA in weitgehend nativer, superhelikaler Form, Ribonukleinsäure und Histonen bestehen. Diese bilden zusammen ein gelartiges Aggregat, dessen Form und Position nach anschließender Zentrifugation in einem neutralen, mit einem Fluorogen versetzten Saccharosegradienten als fluoreszierende Zone in UV-Licht unmittelbar sichtbar gemacht werden kann. Als Fluorogen diente Bisbenzimid.

Da intakte superhelikale DNA eine andere Struktur besitzt als geschädigte, weisen ungeschädigte Nukleioide eine andere Sedimentationskonstante auf als solche mit strukturell modifizierter DNA. Einzelstrangbrüche beispielsweise führen zu einer höheren freien Drehbarkeit der DNA und zum Verlust von superhelikalen Windungen, woraus eine Strukturlockerung und damit eine verringerte Sedimentierbarkeit resultieren. Der Vergleich beider Sedimentationsstrecken von Nukleoiden aus entsprechend behandelten Zellen

und von Kontrollzellen erlaubt somit einerseits Rückschlüsse auf den Schädigungsgrad der Zellen, andererseits Aussagen über den Ablauf von Reparaturvorgängen an der DNA.

3.3.5.2. Ausführung

Gewinnung und Sedimentation der Nukleotide richteten sich im wesentlichen nach dem von Weniger (92,93) empfohlenen Vorgehen.

Mit einem Gradientenmischer (Tegimenta AG Rotkreuz, Schweiz) wurden in 6 Zellulosenitratröhrchen (Centrifuge tubes 33137) lineare Saccharosegradienten (15 - 30 %ige Saccharoselösung, Füllung der Röhrchen bis 9 mm unter den oberen Rand) hergestellt und zur Festigung über Nacht bei 4°C in einer Kühlzelle aufbewahrt. Im Anschluß an diese Wartezeit wurden jedem Gradienten zunächst 0,34 ml Lyselösung (Herstellung s.u. 3.1.) und dieser anschließend 0,25 ml Zellsuspension überschichtet. Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie in 3.3.2. beschrieben. Die Zellkonzentration wurde auf 5×10^6 Zellen je ml eingestellt.

Die Zellulosenitratröhrchen wurden in die Schwenkbecher des Rotors verbracht und die Zellen - abgedunkelt - bei Zimmertemperatur 20 min der Lyselösung ausgesetzt. Anschließend wurden die Ansätze 90 min lang bei 20°C und 20.000 U/min (68.200 x g) zentrifugiert (Beckmann-Ultrazentrifuge L2, Rotor SW 41).

3.3.6. DNA-Konzentration

1 ml des nach 3.3.3.1 gewonnenen Überstandes wurde bei 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) im Spektralphotometer (PMQ II, Zeiss) auf seine Extinktion hin gemessen. Als Leerwert diente eine DNA-freie Perchlorsäurelösung (1 Mol/l). Die DNA-Konzentration wurde anhand einer Eichkurve in einem Konzentrationsbereich von 0,0625 - 1 mg DNA/ml bestimmt.

3.4. Auswertung der Ergebnisse

3.4.1. Markierungsmethoden

Von den flüssigszintillationsspektrometrisch gemessenen Impulsen (cpm) bzw. den über Quenchkorrektur ermittelten tatsächlichen Zerfällen (dpm) wurde die Untergrundradioaktivität abgezogen. Die Zerfälle/min (dpm) wurden auf den jeweiligen DNA-Gehalt der Probe bezogen und für 1 mg DNA berechnet.

Die prozentuale Darstellung der in vitro-Analysen erfolgte durch Bezug der spezifischen ³H-Aktivität (dpm/mg) DNA auf die Werte der unbehandelten Kontrollprobe. Bei in vivo-Analysen wurden zu jedem untersuchten Wert scheinbehandelte Hühnerembryonen im gleichen Analysengang mitgeführt; sie dienten als prozentualer Bezugspunkt (= 100 %) für den untersuchten Wert.

3.4.2. Nukleoidsedimentation

Die Position des DNA-Bisbenzimid-Komplexes wurde unter einer UV-Lampe (Emission bei 366 nm) sichtbar gemacht (blau-fluoreszierende Banden); die Sedimentationsstrecke, definiert als die Entfernung der Bandenmitte vom oberen Flüssigkeitsmeniskus in den Zentrifugenhülsen, wurde, soweit möglich, gemessen und mit den Kontrollproben verglichen. Dabei hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Ausmessung erst am nächsten Tag vorzunehmen, da dann eine Stabilisierung der Banden eingetreten war. Zur weiteren Dokumentation wurden die fluoreszierenden Banden unter Verwendung eines Spezial-UV-Fluoreszenz-Filters photographiert.

3.5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Innerhalb einer Versuchsreihe wurden die Mittelwerte der Parallelansätze berechnet. Bei Wiederholungsanalysen wurden die so erhaltenen Werte der Einzelversuche gemittelt und graphisch mit den Standardabweichungen dargestellt. Ließen die Kurven einen nahezu linearen Verlauf erkennen, wurden die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient r berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Versuche zur Methodik

Da in früheren Arbeiten bereits Versuche zur SDS und UDS an Thymus-, Milz- und Knochenmarkszellen der Ratte durchgeführt (18,76) und dabei die Versuchsbedingungen so weit wie möglich optimiert worden waren, sollte v. a. die Übertragbarkeit der Methodik auf die Hepatozyten des Hühnerembryos untersucht werden.

4.1.1. Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine reine DNA-Lösung mit den in Abb. 4.1.1. angegebenen Konzentrationen hergestellt und den gleichen Versuchsbedingungen wie die Markierungsanalysen unterworfen. Die spektrophotometrischen Messungen erfolgten bei 260 nm mit DNA-freier Perchlorsäure (1 Mol/l) als Referenzlösung.

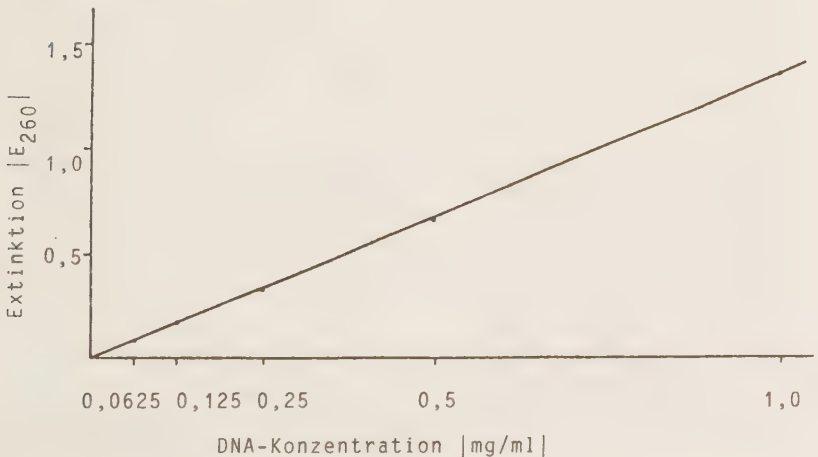


Abb. 4.1.1. DNA-Eichkurve - photometrische Messung
 Extinktion in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration. $n = 3$.
 Lineare Regressionsgerade: $y = -0,005 + 1,375 x$; $r = 0,9999$.

4.1.2. ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Zellkonzentration

Wie in Abb. 4.1.2. dargestellt, nahm die ³H-Aktivität der säurefällbaren Fraktion für den Bereich von 0,5 bis 2 Millionen Zellen/ml bei 90 min Inkubation direkt proportional zur Zellkonzentration zu (Lineare Regressionsgerade: $y = -29,8 + 1975,5 x$; $r = 0,9994$. Die Abweichung der Geraden vom Nullpunkt liegt innerhalb der Standardabweichung). Erst bei Konzentrationen von mehr als 4×10^6 Zellen/ml zeigte sich ein etwas flacher werdender ³H-dT-Einbau.

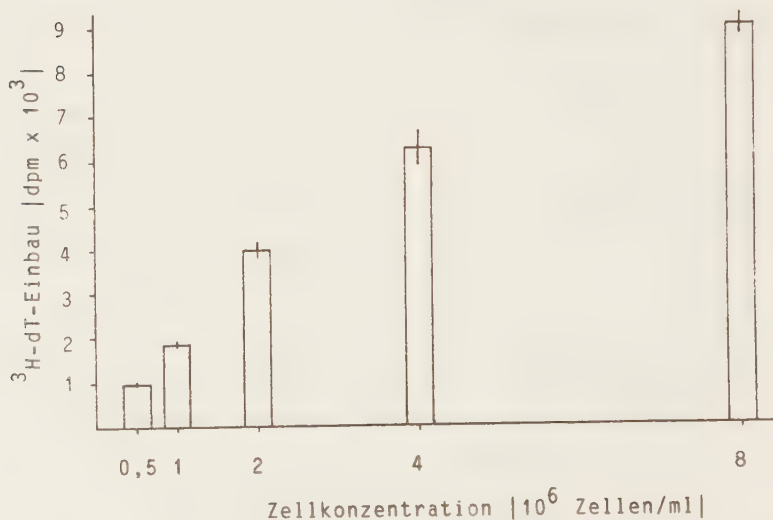


Abb. 4.1.2. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Konzentration der Leberzellen. Hauptinkubation: 90 min. n = 3.

4.1.3. ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte sich bei einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml ein zunächst steiler, etwa ab 90 min flacher werdender Anstieg des ³H-dT-Einbaues. Mit einer gewissen Sättigung des Einbaues ist somit erst bei verhältnismäßig langen Inkubationszeiten zu rechnen (Abb. 4.1.3.).

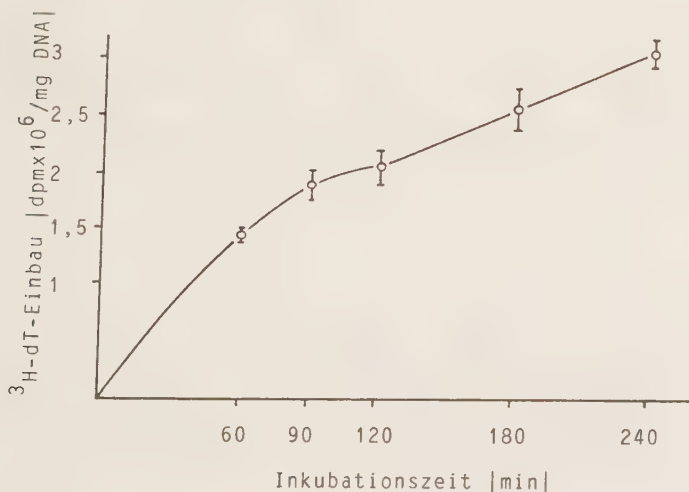


Abb. 4.1.3. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. n = 3. 2×10^6 Zellen/ml.

4.1.4. ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der ³H-dT-Konzentration

In dem gewählten ³H-dT-Konzentrationsbereich von 23,125 bis 185 kBq/Ansatz erhöhte sich der ³H-dT-Einbau in die säurefällbare Fraktion im Bereich von 23,125 - 92,5 kBq/Ansatz direkt proportional zur Konzentration der DNA-Vorstufe (Abb. 4.1.4.; lineare Regressionsgerade für diesen Bereich: $y = 15.902,4 \text{ dpm} + 296.475,7 x$; $r = 0,9988$. Die Nullpunktabweichung lag innerhalb der Standardabweichung).

Bei einer Konzentration über 92,5 kBq flachte der ³H-dT-Einbau ab.

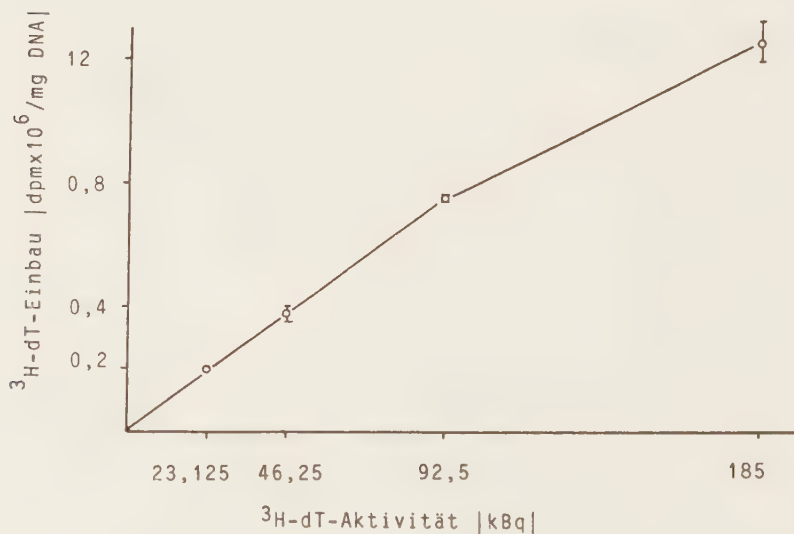


Abb. 4.1.4. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit der ³H-dT-Konzentration. 2×10^6 Zellen/ml. $n = 3$.

4.1.5. H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Hydroxyharnstoff (HU)-Konzentration

HU hemmt über eine Entleerung des Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Pools die semikonservative DNA-Synthese (64,74). Die Verbindung erzeugt einen Mangel an DNA-Vorstufen, indem sie das Ribonukleotidreduktase-System, das für die Bereitstellung von dNTP verantwortlich ist, blockiert (65,89). Die Reparaturkapazität der Zelle wird nicht wesentlich von HU beeinträchtigt (6,11). Es ist daher üblich, zur Untersuchung der unprogrammierten (reparaturbedingten) DNA-Synthese (UDS) die an der Gesamt-DNA-Syntheseleistung in wesentlich größerem Umfang beteiligte semikonservative DNA-Synthese mit HU zu hemmen (78).

Über die Wirkung von HU auf die SDS der Hepatozyten des Hühnerembryos lagen nur orientierende Untersuchungen (80) vor, so daß entsprechende eigene Versuche notwendig waren.

4.1.5.1. Hydroxyharnstoff in der Vorinkubation

In Anlehnung an frühere Arbeiten bei Zellen der Ratte (18, 76) wurde zunächst ein Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-2} Mol/l HU getestet, ohne damit jedoch eine überzeugende Hemmung des semikonservativen H-dT-Einbaues zu erreichen (nicht eigens dargestellt). Wie Abb. 4.1.5.1. zeigt, konnte die DNA-Synthese erst bei Konzentrationen von mehr als 10^{-1} Mol/l dosisabhängig beeinflusst werden (DE : 10^{-1} Mol/l).

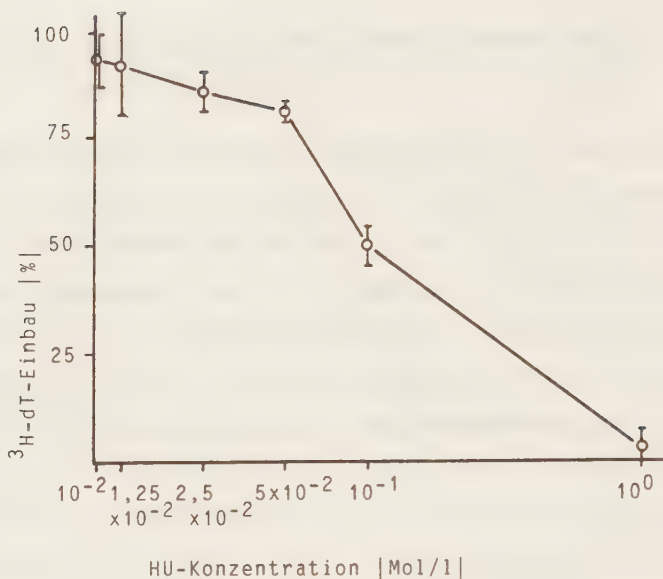


Abb. 4.1.5.1. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Hydroxyharnstoff (HU)-Konzentration während der Vorinkubation. Abszisse im logarithmischen Maßstab. $n = 3$. 100 % = $3.863.937 \pm 105.046$ dpm/mg DNA.

4.1.5.2. Hydroxyharnstoff in der Hauptinkubation

Da der ³H-dT-Einbau in die DNA durch die Anwesenheit von HU während der Vorinkubation erst von hohen HU-Konzentrationen an beeinflussbar war, interessierte auch der Einfluß während der 90minütigen Hauptinkubation. Die DE lag hier bei einer Konzentration von ca. $2,5 \times 10^{-2}$ Mol/l.

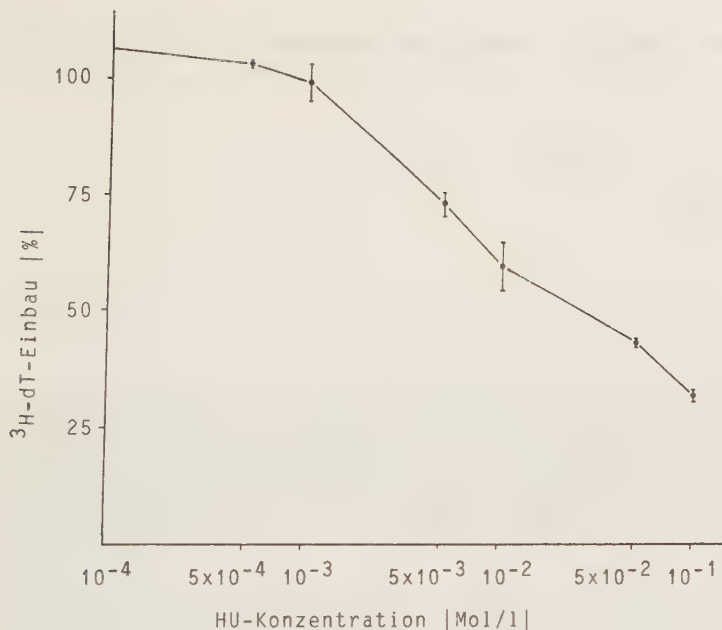


Abb. 4.1.5.2. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Hydroxyharnstoff(HU)-Konzentration während der Hauptinkubation. Abszisse im logarithmischen Maßstab. $n = 3$. 100% = $1.158.913 \pm 149.864$ dpm/mg DNA.

4.1.6. Isotopenverdünnung

Hinweise auf mögliche Veränderungen des endogenen Thymidin-³pools und ihren Einfluß auf den ³H-dT-Einbau in die DNA sollten durch Zugabe unmarkierten Thymidins in Konzentrationen von 1 - 128 µg/ml (4,1 - 528,9 µMol/l) während der Vorinkubation gewonnen werden (Abb.4.1.6.). Erwartungsgemäß wurde der Einbau markierten Thymidins durch steigende Konzentrationen unmarkierten Thymidins zurückgedrängt.

50,9%ige Hemmung konnte durch Zusatz von 8 μg dT/ml erreicht werden.

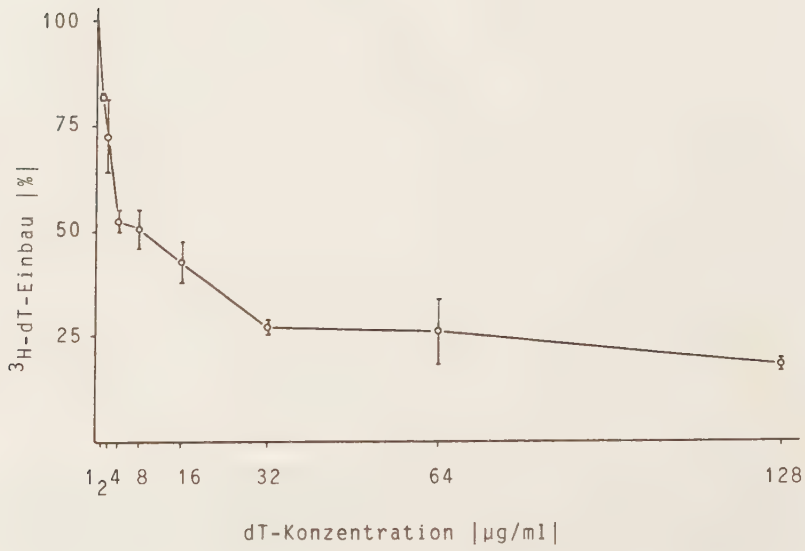


Abb. 4.1.6. ³Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der dT-Konzentration während der Vorinkubation. $n = 3$. 100% = 934.036 ± 38.569 dpm/mg DNA.

4.1.7. Nukleoidsedimentation

4.1.7.1. Einfluß der Zellzahl

Die Zellzahl der auf den Gradienten aufgetragenen Zellsuspension variierte zwischen $0,5 \times 10^6$ und 10×10^6 Zellen/ml. Dabei zeigten die Proben mit 5×10^6 bis 10×10^6 Zellen/ml die deutlichste Bandenbildung. Die Sedimentationsstrecken unterschieden sich nur geringfügig (Foto 4.1.7.1.).

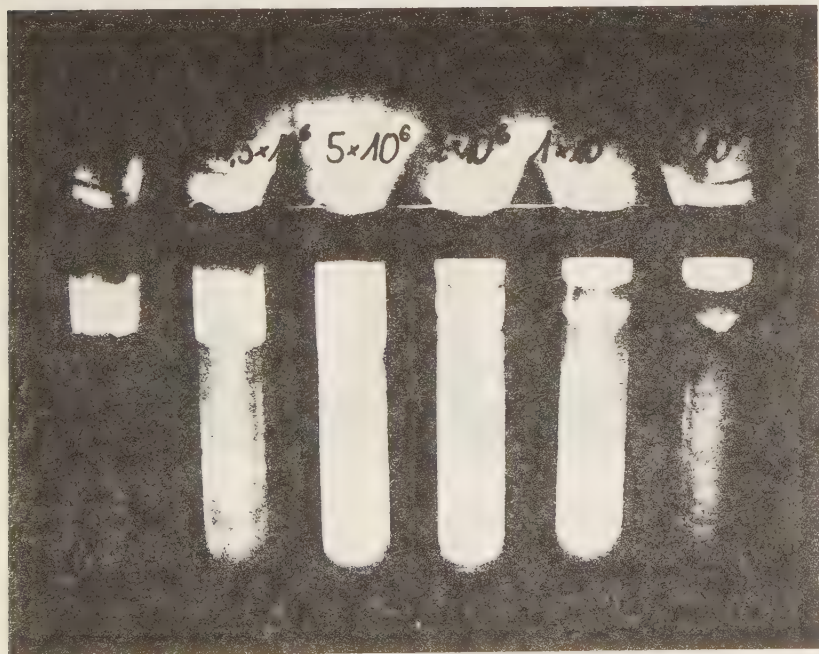


Foto 4.1.7.1. Einfluß der Zellzahl auf die Nukleoidsedimentation. Von links nach rechts: 10×10^6 Zellen/ml bis $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

4.1.7.2. Einfluß der Lysezeit

Die Lysezeit variierte zwischen 15, 30 und 60 min. Bereits nach 15 min waren die Nukleotide aufgeschlossen (Foto 4.1.7.2.). Die Sedimentationsstrecken unterschieden sich kaum: 15 min - 2,1 cm / 30 min - 2,1 cm / 60 min - 2,2 cm.

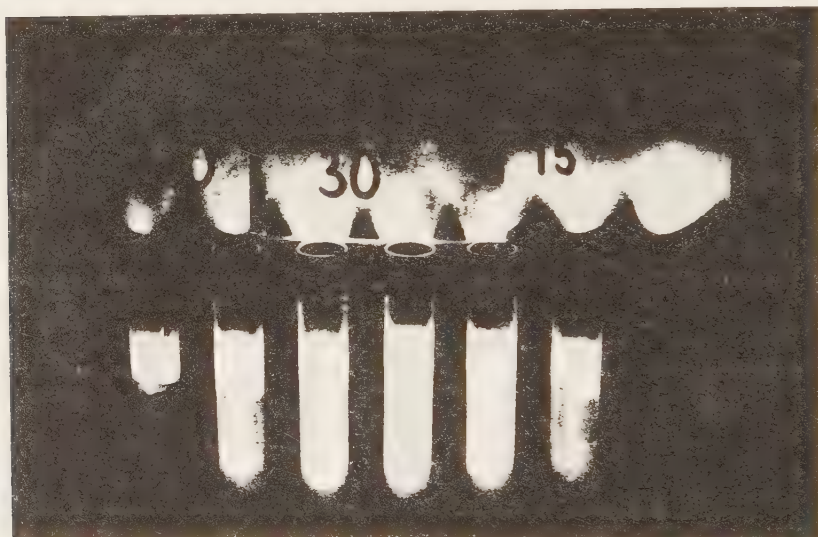


Foto 4.1.7.2. Einfluß der Lysezeit auf die Nukleoidsedimentation. Von links nach rechts: Lysezeit 60, 30 und 15 min. Doppelbestimmung.

4.1.7.3. Einfluß des Gradienten und der Zentrifugationsbedingungen auf die Sedimentationsstrecke

Von entscheidender Bedeutung für die Auswertung der Ergebnisse der Nukleoidsedimentation ist eine ausreichend weite Sedimentationsstrecke, die als Maß für den Schädigungsgrad der DNA gilt (vgl. 3.3.5.1.). Da im ursprünglich verwendeten Gradienten (15 - 30 %ige Saccharoselösung) bereits die ungeschädigte DNA eine relativ kurze Sedimentationsstrecke bei relativ breiter Bandenbildung aufwies, wurde der Einfluß der Steilheit des Saccharosegradienten auf die Sedimentationsstrecke untersucht. Gleichzeitig wurden dabei die Zentrifugationsbedingungen variiert.

Getestet wurden Gradienten von 7,5 - 20%, 7,5 - 25%, 5 - 30% und 15 - 30% in Kombination mit einer Zentrifugation bei 15.000, 20.000 und 25.000 Upm und Zentrifugationszeiten von 60, 75 und 90 min (nicht eigens dargestellt).

Es zeigte sich, daß - unabhängig von der Steilheit des Gradienten - mit zunehmender Zentrifugalkraft die Entfernung vom oberen Flüssigkeitsmeniskus zur oberen Bandengrenze zwar zunimmt, gleichzeitig jedoch die einzelnen Banden weiter auseinander gezogen und in ihrer unteren Begrenzung unschärfer wurden.

Eine aussagekräftigere Bestimmung der mittleren Sedimentationsstrecke ließ sich mit den angeführten Versuchen nicht erreichen.

4.2. Festlegung der Versuchsbedingungen

4.2.1. Semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese (SDS und UDS)

Die Zellsuspension wurde auf 2×10^6 /ml Suspension eingestellt. Je Hühnerembryo standen ca. 8×10^6 Leberzellen zur Verfügung. Um die erforderliche Anzahl an Zellen zu erreichen, wurden bei in vitro-Versuchen mehrere Lebern gepoolt. Bei in vivo-Versuchen wurden mindestens je zwei Lebern gleichbehandelter Hühnerembryonen gepoolt, um so die innerhalb einer gleichbehandelten Gruppe erforderliche Zellzahl zu erreichen.

Die Vorinkubation der Leberzellen wurde auf 30 min, die Hauptinkubation auf 90 min festgelegt. Um eine auswertbar hohe Impulsrate zu erreichen, wurde zur Ermittlung der SDS 3 H-dT mit einer Aktivität von 1,25 μ Ci (46,25 kBq) und zur Ermittlung der UDS den Zellen 3 H-dT mit einer Aktivität von 5,0 μ Ci (185 kBq)/Probe zugesetzt.

Bei Versuchen zur UDS wurde der Hanks-Lösung von Versuchsbeginn an Hydroxyharnstoff in einer Konzentration von 10^{-1} Mol/l zugegeben. Zur Stimulation des unprogrammierten 3 H-dT-Einbaues wurden die Leberzellen röntgen- und UV-bestrahlt (vgl. 4.3.1.2. und 4.3.2.2.).

4.2.2. Isotopenverdünnungsanalyse

Um Hinweise zu erhalten, inwieweit strahlenbedingte Effekte in Leberzellen wirklich auf eine Veränderung der DNA-Synthese und nicht auf Schwankungen der Thymidin-Poolgrößen zurückzuführen sind (Abb. 4.1.6.), wurden einem Teil der Ansätze 8 µg unmarkiertes Thymidin (dT)/ml zugesetzt. Mit dieser dT-Konzentration konnte nach Auffüllung des Thymidin-pools eine etwa 50%ige Hemmung des ^3H -dT-Einbaues erzielt werden.

4.2.3. Nukleoidsedimentation

Die Leberzellkonzentration wurde auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Nach einer Lysezeit von 20 min wurden die Ansätze 90 min lang bei 20.000 Upm bei 20°C zentrifugiert. Als Gradient wurde eine 15 - 30%ige Saccharoselösung verwendet. Beim Versuch, strahlenbedingte DNA-Schäden nachzuweisen, wurden die Zellen vor der Lyse in vitro mit Dosen bis 28 Gy, die Hühnerembryonen in vivo mit Dosen bis 8 Gy bestrahlt. Bei in vivo-Bestrahlung erfolgte eine Aufarbeitung nach verschiedenen Reparaturzeiten.

4.3. In vitro-Versuche zur Charakterisierung der Leberzellen

4.3.1. Röntgenbestrahlung

4.3.1.1. Einfluß von Röntgenbestrahlung auf die SDS

Die in vitro-Bestrahlung der Zellen erfolgte nach einer 30-minütigen Vorinkubation in Hanks-Lösung in einem Dosisbereich von 1,75 - 56 Gy. Anschließend wurden die Zellen in der Hauptinkubation mit ^3H -dT markiert. Abb. 4.3.1.1. zeigt bis 7 Gy einen zunächst steileren, dann jedoch flacheren Abfall des ^3H -dT-Einbaues.

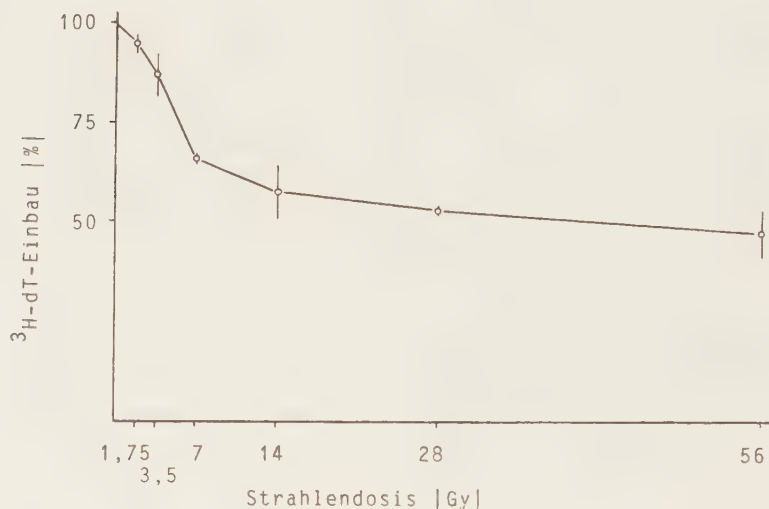


Abb. 4.3.1.1. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Röntgenbestrahlungsdosis. $n = 3$.
100% = $1.569.651 \pm 1132$ dpm/mg DNA.

4.3.1.2. Einfluß von Röntgenbestrahlung auf die UDS

Röntgenbestrahlung löst bevorzugt Kurzkettenreparatur aus (45), die außerordentlich rasch abläuft (Halbwertszeit im Bereich von Minuten). So läßt sich auch nach relativ hohen Bestrahlungsdosen nur die Tendenz einer Stimulierung des Reparatursystems feststellen (Abb.4.3.1.2.). Bei einer Dosis von 56 Gy wurde lediglich eine Einbaurrate von 117,1% gegenüber den unbestrahlten Kontrollen (100%) erreicht.

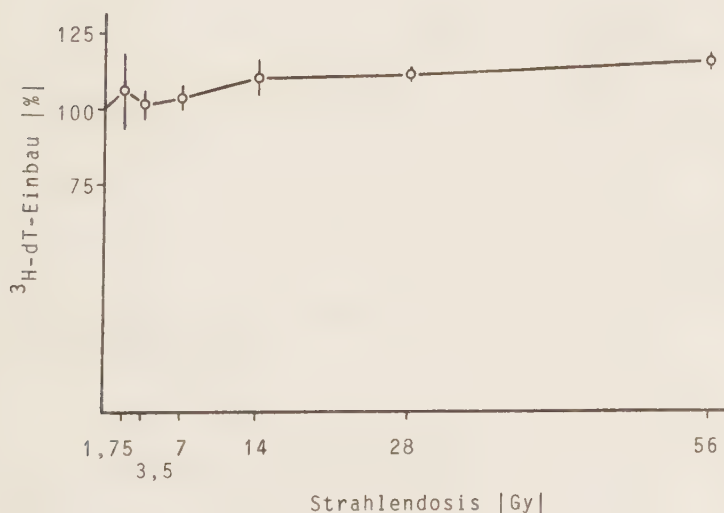


Abb. 4.3.1.2. ³Unprogrammierter H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Röntgenbestrahlungsdosis. $n = 3$.
100% = 138.251 ± 4523 dpm/mg DNA.

4.3.2. UV-Licht

4.3.2.1. Einfluß von UV-Licht auf die SDS

Während eine Bestrahlungsdosis von $8 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ noch ohne Einfluß auf die semikonservative ^3H -dT-Einbaurrate blieb, zeigte sich ab $16 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ eine signifikante Abnahme der ^3H -dT-Aktivität (Abb. 4.3.2.1.). Bereits bei einer UV-Dosis von $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ betrug der ^3H -dT-Einbau in die DNA nur noch 50% der unbestrahlten Kontrollwerte.

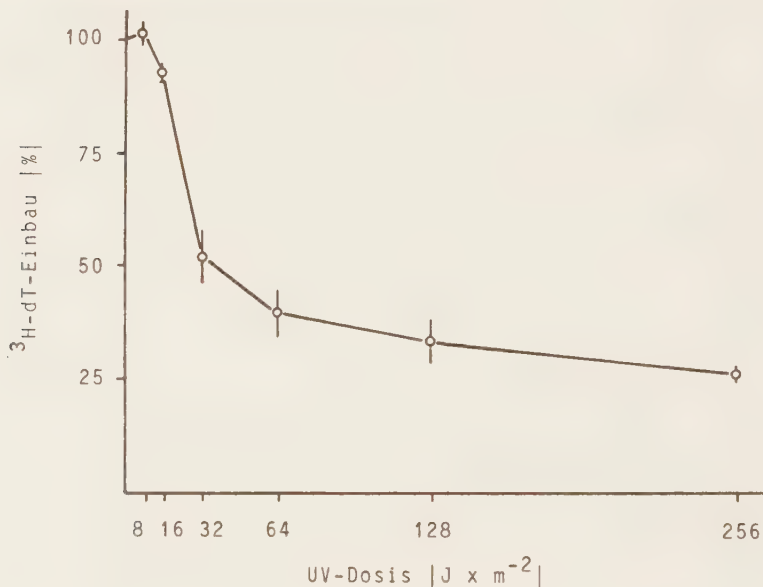


Abb. 4.3.2.1. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der UV-Dosis. $n = 3$.
100% = $1.649.065 \pm 10.385 \text{ dpm/mg DNA}$.

4.3.2.2. Einfluß von UV-Licht auf die UDS

UV-Licht zieht eine Langkettenreparatur nach sich (13,82). Die Prüfung des Bestrahlungseinflusses erbrachte bei UV-Dosen von $8 - 64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ eine Zunahme des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues zwischen 30 und 75 % (Abb. 4.3.2.2.). Durch weitere Erhöhung der UV-Dosis war kaum noch eine Steigerung des ^3H -dT-Einbaues zu erzielen. Bei $256 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ verhielt sich die UDS rückläufig.

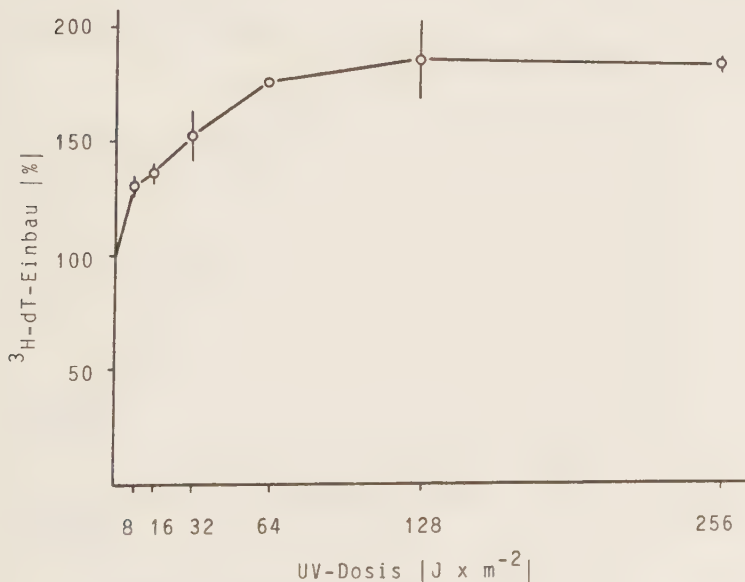


Abb. 4.3.2.2. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der UV-Dosis. $n = 3$.
 $100\% = 651.279 \pm 4659 \text{ dpm/mg DNA}$.

4.3.3. Methansulfonsäuremethylester (MMS)

4.3.3.1. Einfluß von MMS auf die SDS

MMS schädigt die DNA durch Methylierung (83). Aus Abb.

4.3.3.1. ist ersichtlich, daß die semikonservative DNA-Synthese der Leberzellen durch MMS in der Vorinkubation dosisabhängig gehemmt wird. Eine 50%ige Hemmung gegenüber der MMS-freien Kontrolle wurde für eine Konzentration von ca. $2,5 \times 10^{-3}$ Mol/l ermittelt.

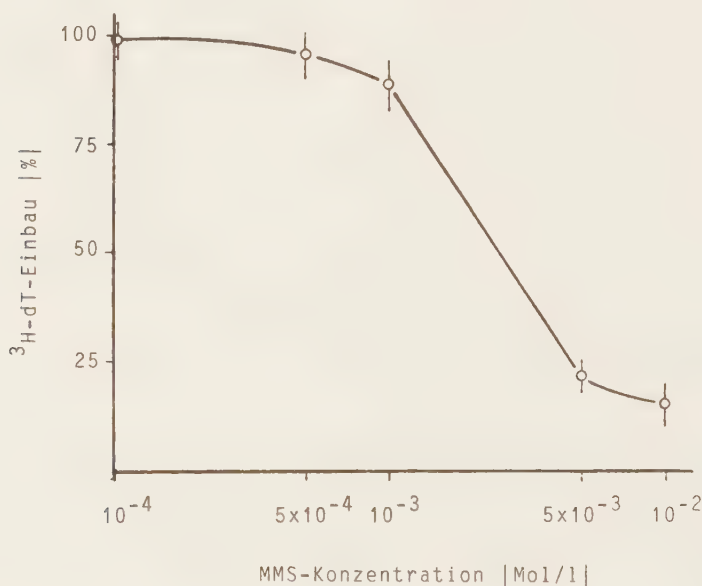


Abb. 4.3.3.1. Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der MMS-Konzentration in der Vorinkubation. Abszisse im logarithmischen Maßstab. $n = 3$.
100% = $2.758.778 \pm 113821$ dpm/mg DNA.

4.3.3.2. Einfluß von MMS auf die UDS

Die von MMS erzeugten Alkylierungen werden, ähnlich wie bei UV-Licht, über einen Langkettenreparaturmechanismus repariert (83). Ob daneben noch Kurzkettenreparatur vorkommt, bleibt bisher unklar. Bei der Untersuchung der UDS unter dem Einfluß steigender MMS-Konzentrationen in der Vorinkubation wurde eine 50%ige Hemmung des ^3H -dT-Einbaues bei einer MMS-Konzentration von ca. $3 \times 10^{-3} \text{ Mol/l}$ erzielt (Abb. 4.3.3.2.). Damit ist kaum ein Unterschied zur semikonservativen DNA-Synthesehemmung feststellbar.

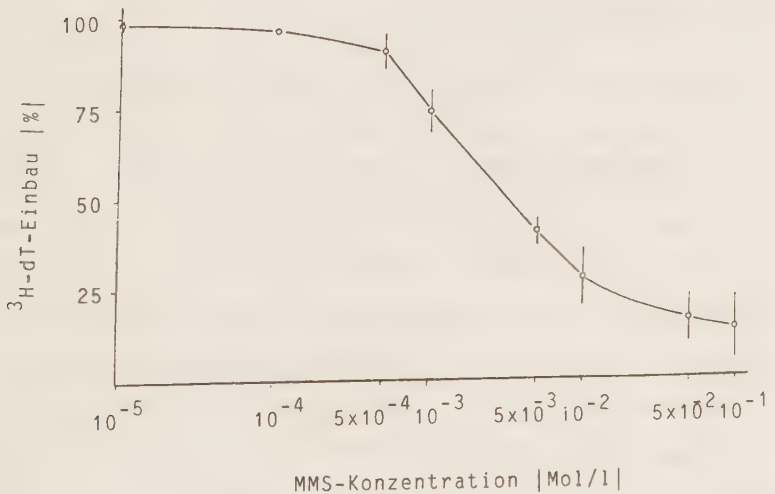


Abb. 4.3.3.2. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der MMS-Konzentration in der Vorinkubation. Abszisse im logarithmischen Maßstab. $n = 3$.
 $100\% = 1.294.395 \pm 11081 \text{ dpm/mg DNA}$.

4.3.4. 1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC)

araC ist ein hochwirksamer Hemmstoff der semikonservativen DNA-Synthese (11,12,81). Seine Wirkung soll einerseits darauf beruhen, daß es als Antimetabolit in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird und damit nachhaltig die Bildung neuer Replikationseinheiten blockiert. Andererseits führt araC durch Konkurrenz mit Desoxycytidintriphosphat zu einer kompetitiven Hemmung der DNA-Polymerase α und damit zu einer Hemmung der Kettenverlängerung (11,24). Die DNA-Polymerase β dagegen ist gegenüber araC unempfindlicher als die DNA-Polymerase α.

4.3.4.1. Einfluß von araC auf die SDS

Die dosisabhängige Hemmung der SDS durch steigende Konzentrationen an araC in der Vorinkubation wurde auch für die Hepatozyten des Hühnerembryos bestätigt (Abb.4.3.4.1.). Eine 50%ige Hemmung der SDS wurde für eine araC-Konzentration von ca. 1,5 µg/ml ermittelt. Dieser Wert liegt zwischen den unter vergleichbaren Bedingungen ermittelten Werten für Thymus-, Milz- und Knochenmarkszellen der Ratte (vgl. S. 102).

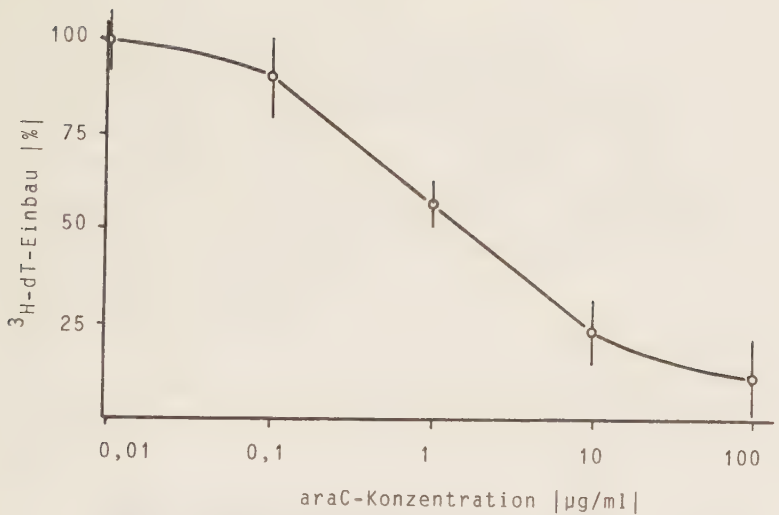


Abb. 4.3.4.1. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der araC-Konzentration in der Vorinkubation. Abszisse im logarithmischen Maßstab.
 n = 3. 100% = $1.381.242 \pm 104799$ dpm/mg DNA.

4.3.4.2. Einfluß von araC auf die röntgenstrahlenstimulierte UDS

Wie unter 4.3.1.2. beschrieben, wurde bei einer Röntgenbestrahlungsdosis von 56 Gy eine Stimulierung der reparaturbedingten DNA-Synthese beobachtet. Im folgenden wurde die Wirkung von araC auf die von dieser Dosis ausgelösten Reparatur untersucht. Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit steigenden araC-Konzentrationen und anschließender Röntgenbestrahlung (56 Gy) wurden bei Konzentrationen bis 1 µg/ml kaum Wirkungen beobachtet. 10 µg/ml verminderten den unprogrammierten ³H-dT-Einbau auf 70% der araC-freien, röntgenstrahlenstimulierten Kontrolle (100%).

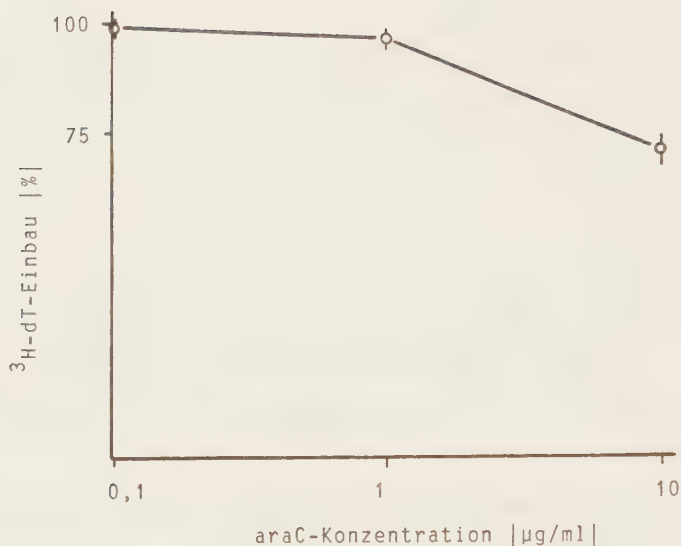


Abb. 4.3.4.2. Röntgenstrahlenstimulierter, unprogrammierter ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der araC-Konzentration in der Vorinkubation. $n = 3$.

100% = 375.329 ± 5147 dpm/mg DNA.

4.3.4.3. Einfluß von araC auf die UV-stimulierte UDS

Durch UV-Licht läßt sich vor allem eine Langkettenreparatur der geschädigten DNA stimulieren (vgl. 4.3.2.2.). So war bei $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ eine Erhöhung der ³H-dT-Einbaurrate auf 150% zu beobachten. Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit steigenden araC-Konzentrationen wurde die UDS mit

32 J x m⁻² stimuliert. Bei allen getesteten araC-Konzentrationen konnte eine eindeutige Hemmung der UV-stimulierten, unprogrammierten DNA-Synthese erreicht werden (Abb. 4.3.4.3.). Bei 10 µg araC/ml wurde der ³H-dT-Einbau in die DNA auf 65,9% gegenüber der araC-freien, UV-stimulierten Kontrolle (100%) vermindert.

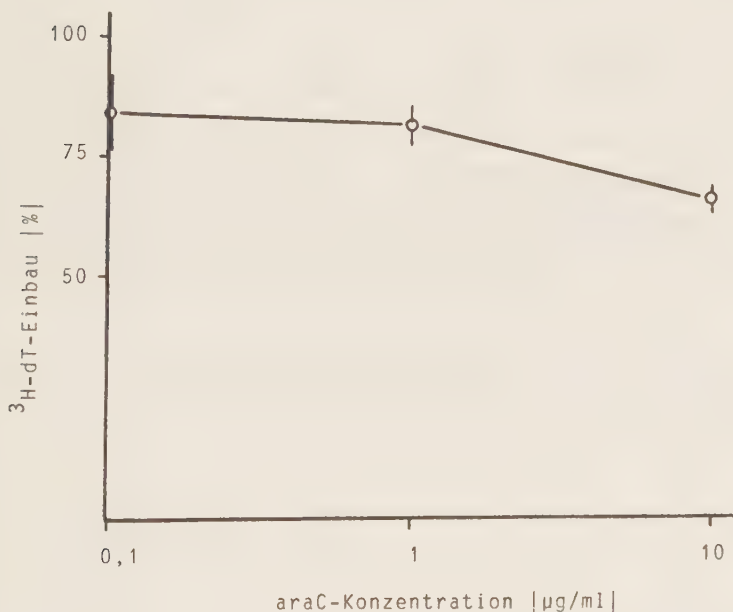


Abb. 4.3.4.3. UV-stimulierter, unprogrammierter ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der araC-Konzentration in der Vorinkubation. $n = 3$. 100% = 712.836 ± 67.195 dpm/mg DNA.

4.3.5. 2',3'-Dideoxythymidin (ddT)

ddT gilt als ein relativ spezifischer Hemmstoff der DNA-Polymerase β (9,11,12). Während die semikonservative DNA-Synthese nur unter der Beteiligung der DNA-Polymerase α abläuft (45,52), wird bei der unprogrammierten DNA-Synthese die Aktivität der DNA-Polymerase β mit der Kurzkettenreparatur in Verbindung gebracht, wie sie beispielsweise durch Röntgenstrahlen ausgelöst wird.

4.3.5.1. Einfluß von ddT auf die SDS

Eine Hemmung der SDS durch steigende Konzentrationen des Polymerase β -Hemmstoffs ddT in der Vorinkubation ist nicht zu beobachten (Abb.4.3.5.1.). Das bestätigt die Annahme, daß die SDS nicht oder nur wenig von der Polymerase β abhängt.

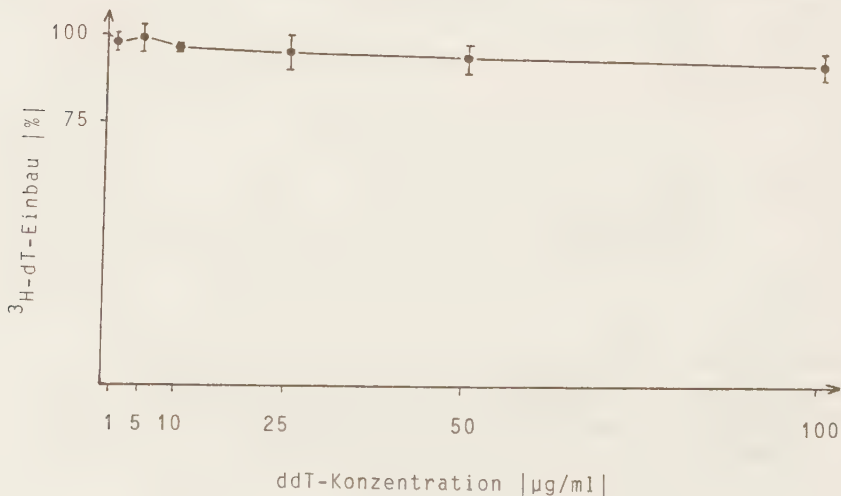


Abb. 4.3.5.1. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der ddT-Konzentration in der Vorinkubation. n = 3. 100% = 1.367.356 ± 37.193 dpm/mg DNA.

4.3.5.2. Einfluß von ddT auf die röntgenstrahlenstimulierte UDS

Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit steigenden ddT-Konzentrationen wurde die UDS mit einer Röntgendosis von 56 Gy stimuliert. Beim anschließenden reparaturbedingten ³H-dT-Einbau in die DNA konnte bereits bei der kleinsten getesteten ddT-Konzentration eine Hemmung erzielt werden (Abb. 4.3.5.2.). Eine Konzentration von 25 µg ddT/ml erbrachte eine Minderung des Tracereinbaues auf 86,4% der ddT-freien, röntgenstimulierten Kontrolle (100%).

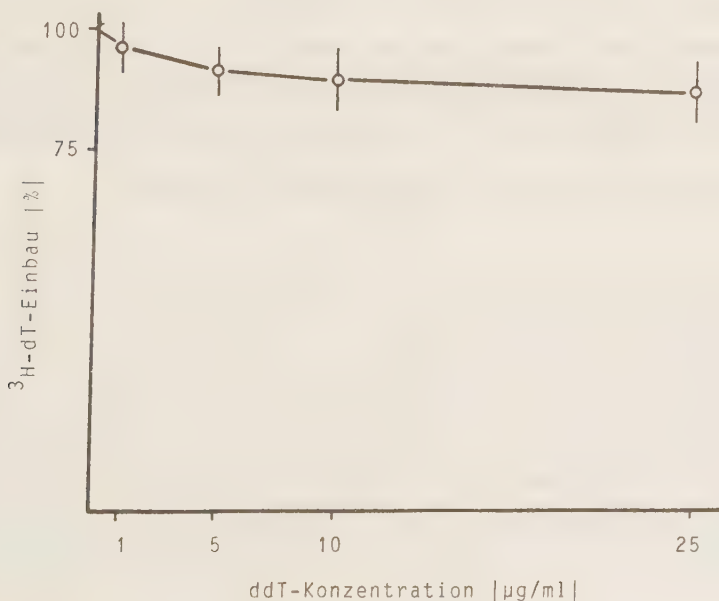


Abb.4.3.5.2. Röntgenstrahlenstimulierter, unprogrammierter
³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der ddT-Konzentration in der Vorinkubation. $n = 3$.
 $100\% = 375.329 \pm 5147 \text{ dpm/mg DNA}$.

4.3.5.3. Einfluß von ddT auf die UV-stimulierte UDS

Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit steigenden ddT-Konzentrationen wurde die UDS mit einer UV-Dosis von $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ stimuliert. Bei allen getesteten ddT-Konzentrationen wurde eine Hemmung der UDS beobachtet (Abb.4.3.5.3.). Bei $25 \mu\text{g ddT/ml}$ wurde nur noch eine ³H-dT-Einbaurate von $64,6\%$ gegenüber der ddT-freien, UV-stimulierten Kontrolle (100%) erreicht.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die DNA-Polymerase β einen großen Anteil an der durch UV-Licht bedingten DNA-Reparatur einnimmt. Das widerspricht der Vorstellung, wonach die UV-stimulierte - *Langketten* -Reparatur hauptsächlich von der Aktivität der DNA-Polymerase α abhängt.

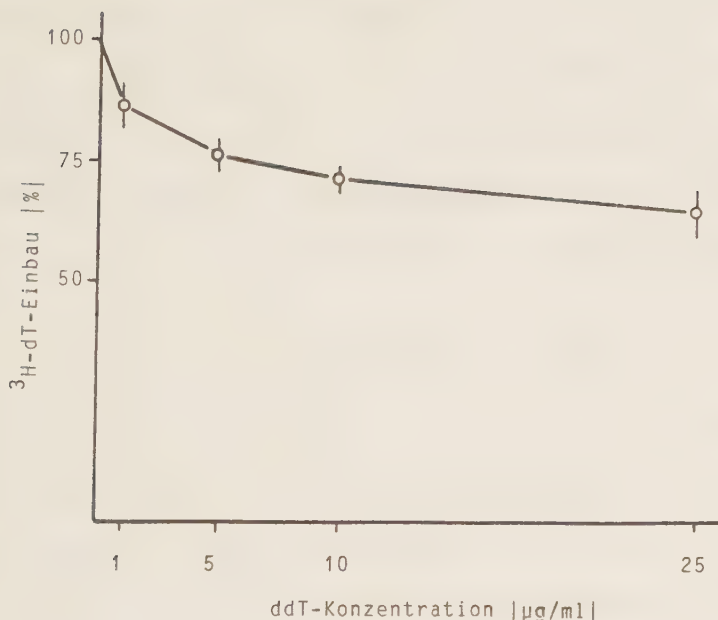


Abb. 4.3.5.3. UV-stimulierter, unprogrammierter ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der ddT-Konzentration in der Vorinkubation. $n = 3$. 100% = 712.836 ± 67.195 dpm/mg DNA.

4.3.6. 3-Aminobenzamid (3-AB)

3-AB gilt als Hemmstoff der Poly(Adenosin-diphospho-ribose)-Synthese. Das empfindliche System, die ADP-Ribosyltransferase, auch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase genannt, ist in seiner Aktivität von der Struktur der DNA abhängig (11,21). Schädigungen der DNA, vor allem Strangbrüche, wie sie durch Röntgenstrahlen hervorgerufen werden, bewirken eine gestei-

gerte Enzymaktivität. Hemmstoffe des Enzymsystems - in vor-
 liegender Arbeit 3-AB - scheinen somit eine Hemmung des DNA-
 Reparaturablaufes zu bewirken.

In jüngster Zeit wird jedoch davon berichtet, daß 3-AB in
 niedrigen Konzentrationen (0,01 - 0,1 mMol/l) den Reparatur-
 ablauf stimulierte und das Auftreten von Strangbrüchen ver-
 mindert (10).

4.3.6.1. Einfluß von 3-AB auf die SDS

Eine Hemmung der SDS in Leberzellen durch steigende
 Konzentrationen an 3-AB in der Vorinkubation ist erst ab
 Dosen ≥ 5 mMol/l erkennbar. Bei einer Dosis von 1 mMol/l war
 keine Hemmung, eher die Tendenz einer Stimulierung des
³H-dT-Einbaues in die DNA festzustellen (Abb. 4.3.6.1.).

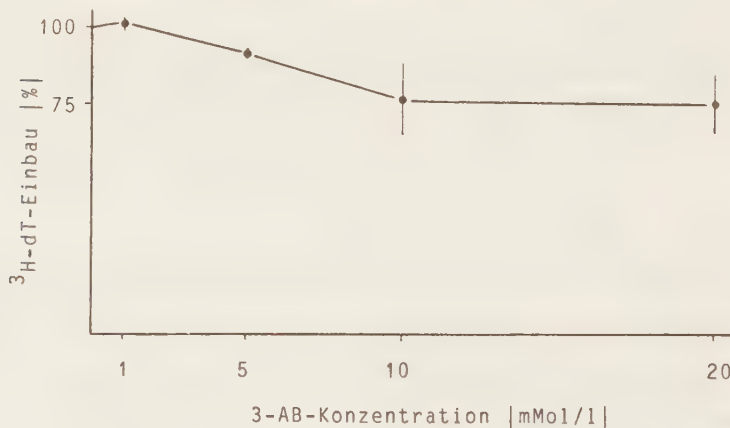


Abb. 4.3.6.1. Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNA in
 Abhängigkeit von der 3-AB-Konzentration in der Vorinkuba-
 tion. $n = 3$. 100% = $4.346.932 \pm 476.101$ dpm/mg DNA.

4.3.6.2. Einfluß von 3-AB auf die röntgenstrahlenstimulierte UDS

Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit 1 bzw. 5 mMol 3-AB/l wurde die UDS mit einer Röntgendosis von 56 Gy stimuliert. Beim anschließenden, reparaturbedingten ^3H -dT-Einbau in die DNA wurde die Tendenz einer Stimulierung festgestellt (Abb. 4.3.6.2.).

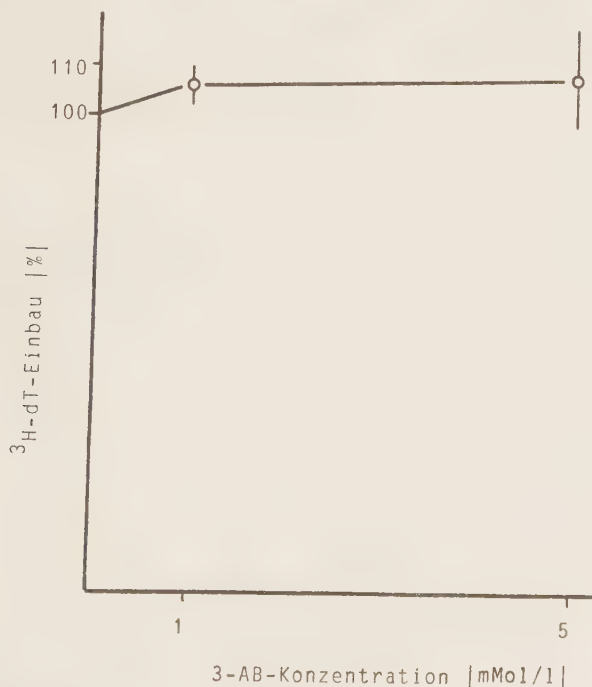


Abb. 4.3.6.2. Röntgenstrahlenstimulierter, unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der 3-AB-Konzentration in der Vorinkubation. $n=3$.

100% = 375.329 ± 5147 dpm/mg DNA.

4.3.6.3. Einfluß von 3-AB auf die UV-stimulierte UDS

Nach 30minütiger Vorinkubation der Leberzellen mit verschiedenen 3-AB-Konzentrationen wurde die UDS mit einer UV-Dosis von $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ stimuliert. In jedem Fall wirkte 3-AB hemmend auf den reparaturbedingten ^3H -dT-Einbau in die DNA (Abb. 4.3.6.3.). Bei 5 mMol 3-AB/l wurde nur noch eine Einbaurrate von 70,7% gegenüber der 3-AB-freien, UV-stimulierten Kontrolle (100%) erreicht.

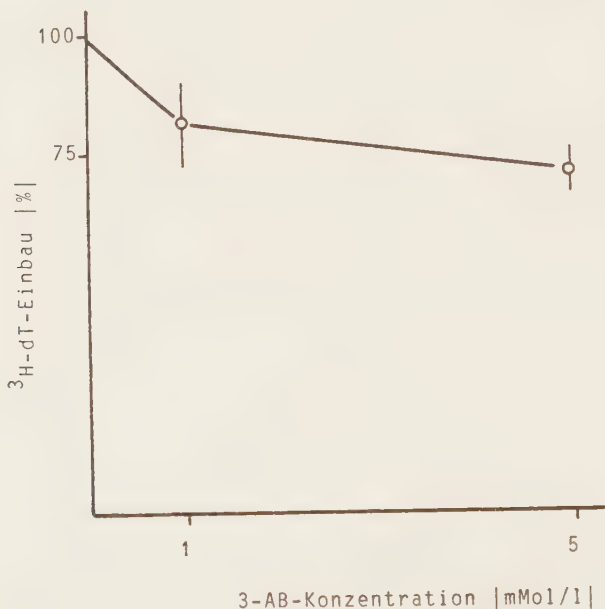


Abb. 4.3.6.3. UV-stimulierter, unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der 3-AB-Konzentration. $n = 3$. $100\% = 712.836 \pm 67.185 \text{ dpm/mg DNA}$.

4.3.7. Ethidiumbromid - Einfluß auf die SDS

Ethidium wird interkalierend an die DNA gebunden, d.h., seine Wirkung beruht auf dem "Einschieben" des Moleküls in die DNA-Doppelhelix (24,81). Zu den unmittelbaren Folgen gehört die Hemmung von semikonservativer und unprogrammierter DNA-Synthese. Vorliegend wurde die SDS nach Vorinkubation der Leberzellen mit Ethidiumbromid dosisabhängig gehemmt (Abb. 4.3.7.) Eine 50%ige Hemmung gegenüber der Ethidiumbromid-freien Kontrolle wurde mit einer Konzentration von ca. 20 $\mu\text{g/ml}$ erreicht.

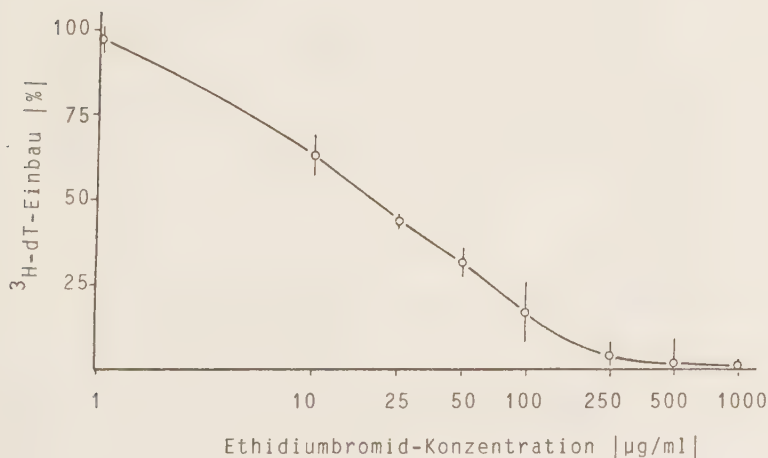


Abb. 4.3.7. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Ethidiumbromidkonzentration in der Vorinkubation. $n = 3$. 100% = $3.256.145 \pm 46.088$ dpm/mg DNA.

4.3.8. Novobiocin - Einfluß auf die SDS

Der DNA-Synthesehemmstoff Novobiocin beeinflusst durch Hemmung der Topoisomerase II die superhelikale Struktur der DNA (18). Aus Abb. 4.3.8. ist ersichtlich, daß die SDS der Leberzellen durch Novobiocin dosisabhängig gehemmt wird. Eine 50%ige Hemmung gegenüber der Kontrolle wurde für eine Konzentration von ca. 500 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Durch 1800 μg Novobiocin/ml Zellsuspension wurde der ^3H -dT-Einbau in die DNA nahezu vollständig unterbunden.

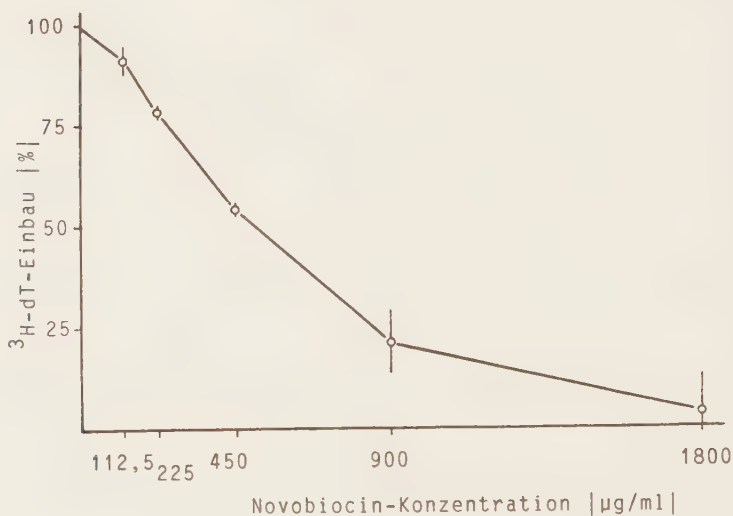


Abb. 4.3.8. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Novobiocin-Konzentration in der Vorinkubation. $n = 3$. 100% = $1.725.184 \pm 5030$ dpm/mg DNA.

4.3.9. Hyperthermie - Einfluß auf die SDS

Wurden die Leberzellen 30, 45, 60, 75 und 90 min lang bei 43°C vorinkubiert und anschließend mit ^3H -dT bei 37°C markiert, kam es gegenüber den bei 37°C vorinkubierten Kontrollen zu einer mit der Dauer der Hyperthermiebehandlung zunehmenden Hemmung der DNA-Synthese um 30% bis 62%.

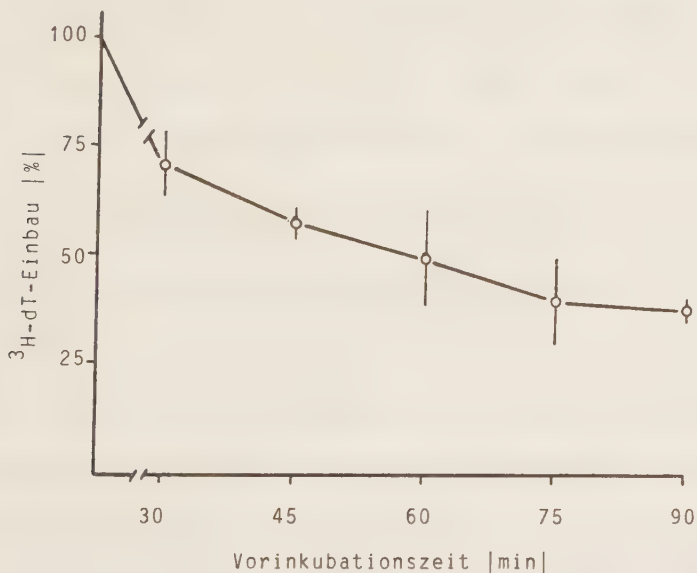


Abb.4.3.9. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA nach Hyperthermie (43°C) während der Vorinkubation. Einbaureate bezogen auf die bei 37°C inkubierten Zellen (100% für 30' = $1.959.875 \pm 168.237$, 45' = $2.181.964 \pm 106.518$, 60' = $2.216.205 \pm 247.371$, 75' = $2.032.336 \pm 65.735$, 90' = $1.954.300 \pm 195.539$ dpm/mg DNA). $n=3$.

4.4. Röntgenstrahlenexposition in vivo *

4.4.1. Einfluß einer akuten Einzelbestrahlung auf die semi-konservative DNA-Synthese (SDS) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo

Unmittelbar bis längstens 48 h nach Röntgenstrahlenexposition in vivo mit Dosen von 8, 4, 1 oder 0,25 Gy wurden die exponierten Hühnerembryonen und ihre scheinbestrahlten Kontrollen aufgearbeitet. Der Zeitpunkt der Bestrahlung wurde dabei so gewählt, daß die Hühnerembryonen am 15. Tag der Entwicklung aufgearbeitet werden konnten.

4.4.1.1. Einmalige Röntgenstrahlendosis von 8 Gy

Eine Röntgenbestrahlungsdosis von 8 Gy entspricht etwa der LD_{50(24h)} für den 15 Tage alten Hühnerembryo (7,91). In den eigenen Versuchen wurde diese *Oberflächendosis* von allen Hühnerembryonen überlebt. Während unmittelbar nach Bestrahlung noch keine Auswirkungen auf die SDS feststellbar sind (Abb. 4.4.1.1.), ist 3 h nach Bestrahlung die Einbaurrate auf 28,4 % gegenüber den unbestrahlten Kontrollen (100 %) reduziert. Auffällig ist die relativ schnelle Regeneration der SDS, so daß bereits 24 h nach Bestrahlung (mit einer Einbaurrate von 95,3 %) kaum noch ein Unterschied zu den unbestrahlten Kontrollen besteht. 48 h nach Bestrahlung wurde eine Einbaurrate von 104,5 % gemessen.

* Numerische Mittelwerte der 100%-Werte sämtlicher in vivo-Versuche siehe Tab. 5.1.2., S. 103.

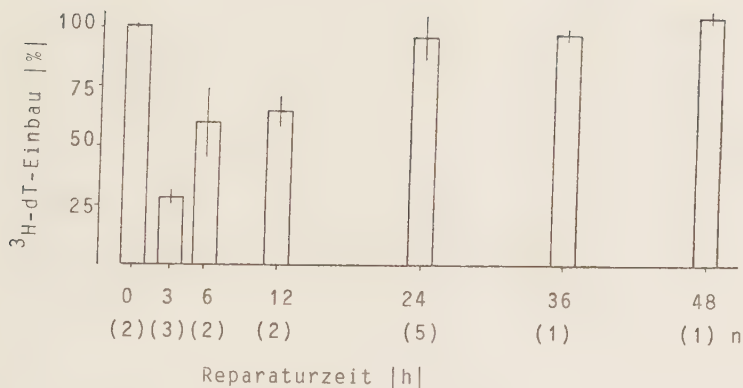


Abb. 4.4.1.1. Einfluß einer Strahlendosis von 8 Gy in vivo auf den semikonservativen $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo.

n = Anzahl der Versuche.

4.4.1.2. Einmalige Röntgenstrahlendosis von 4 Gy

Analog zum vorhergegangenen Versuch trat 3 h nach Bestrahlung die ausgeprägteste Reduktion des $^3\text{H-dT}$ -Einbaues (37,8 %) auf (Abb. 4.4.1.2.), während 24 h nach Bestrahlung die SDS nahezu ausgeglichen erscheint ($87,2 \pm 15,3 \%$).

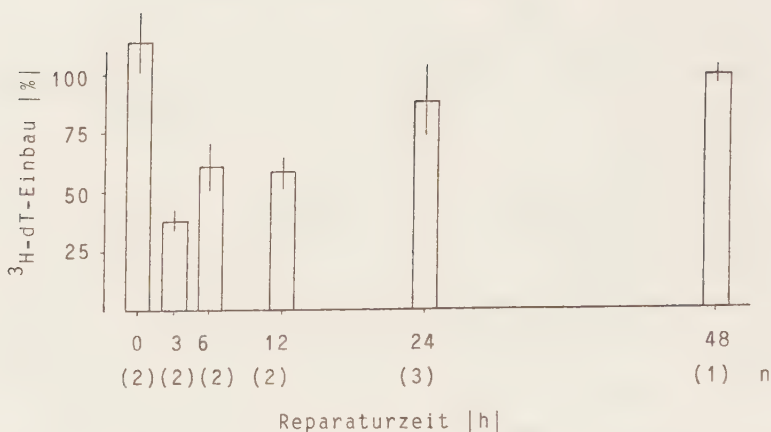


Abb. 4.4.1.2. Einfluß einer Strahlendosis von 4 Gy in vivo auf den semikonservativen $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo.

n = Anzahl der Versuche.

4.4.1.3. Einmalige Röntgenstrahlendosis von 1 Gy

Während in den beiden vorangegangenen Versuchen 3 h nach Röntgenbestrahlung mit 8 bzw. 4 Gy eine ausgeprägte Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese auftrat, bewirkte eine Dosis von 1 Gy nach dieser Reparaturzeit (Abb. 4.4.1.3.) lediglich eine Minderung der $^3\text{H-dT}$ -Einbaurrate auf 83,3 % der scheinbestrahlten Kontrolle (100 %). 24 h nach Bestrahlung war keine Wirkung auf die SDS mehr nachweisbar (108,3 %).



Abb. 4.4.1.3. Einfluß einer Strahlendosis von 1 Gy in vivo auf den semikonservativen ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Reparaturzeit.

4.4.1.4. Einmalige Röntgenstrahlendosis von 0,25 Gy

Eine Strahlendosis von 0,25 Gy zeigte keinen Einfluß mehr auf die SDS (nicht eigens dargestellt). 3 h nach Bestrahlung wurde eine Einbaurrate von 113,6 % und nach 24 h eine solche von 86,9 % gemessen. 48 h nach Exposition wiesen die in vivo röntgenbestrahlten Hepatozyten gegenüber den Kontrollen eine rund 14%ig höhere ³H-dT-Einbaurrate auf.

4.4.2. Einfluß einer akuten Bestrahlungsdosis auf den endogenen Thymidinpool

Im in vitro-Versuch (vgl. 4.1.6.) wurden mit 8 μg unmarkierten Thymidins (dT)/ml (= 32,8 $\mu\text{Mol/l}$) eine etwa 50%ige Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA erreicht. Auch 24 h nach einer Röntgenbestrahlung mit 8 Gy erzielten 8 μg dT/ml eine Hemmung von 54,9 % (Abb. 4.4.2.), woraus geschlossen werden kann, daß Röntgenbestrahlung den endogenen Thymidinpool zum gewählten Zeitpunkt nicht beeinflußt.



Abb. 4.4.2. Prozentuale Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA durch 8 μg dT/ml 24 h nach einer einmaligen Bestrahlung mit 8 Gy.

4.4.3. Einfluß einer akuten Bestrahlungsdosis auf die unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo

In den unter 4.4.1. beschriebenen Versuchen zeigten sich markante Ergebnisse nach einer Reparaturzeit von 3 bzw. 24 h. In den folgenden Versuchen wurden daher die Auswirkungen einer Dosis von 4 und 8 Gy auf die UDS untersucht.

4.4.3.1. UDS nach einer Reparaturzeit von 3 h

3 h nach einer einmaligen Strahlendosis von 4 bzw. 8 Gy zeigte sich bei der niedrigeren Dosis eine ausgeprägtere Stimulation der reparaturbedingten DNA-Synthese als bei der höheren (Abb. 4.4.3.1.). Im Wiederholungsversuch³ (schraffierte Säulen) fielen die ³H-dT-Einbausraten in beiden Fällen zwar deutlich niedriger aus, die Tendenz der Aussage jedoch wurde bestätigt.

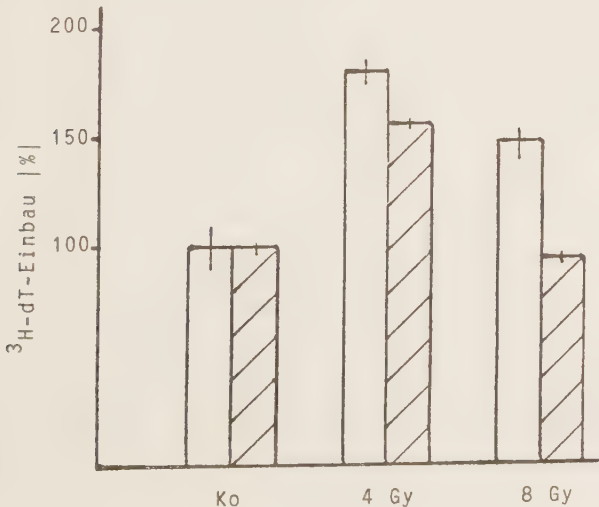


Abb.4.4.3.1. Einfluß einer Strahlendosis von 4 und 8 Gy auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in die DNA nach einer Reparaturzeit von 3 h.

(Schraffierte Säulen = Wiederholungsversuch).

4.4.3.2. UDS nach einer Reparaturzeit von 24 h

Im Gegensatz zum vorstehenden Versuch kehren sich nach einer Reparaturzeit von 24 h die Verhältnisse um (Abb. 4.4.3.2.): Während bei einer Dosis von 4 Gy eine kaum noch reparaturbedingt erhöhte ^3H -dT-Einbaurrate (von 111,8 % gegenüber den scheinbestrahlten Kontrollen) festzustellen ist, bewirkt eine Dosis von 8 Gy eine Stimulierung des Reparatursystems auf 204,8 %.

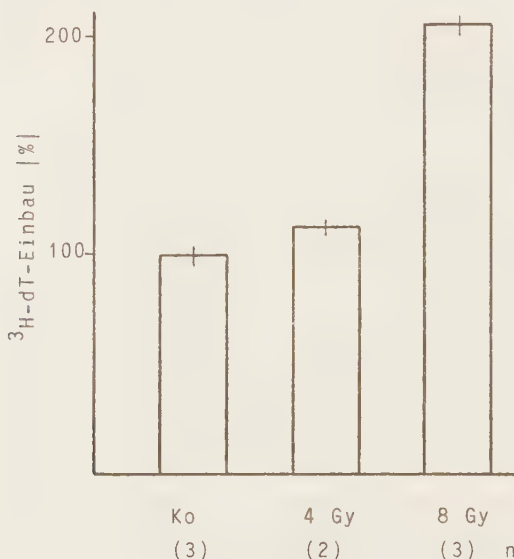


Abb.4.4.3.2. Einfluß einer Strahlendosis von 4 bzw. 8 Gy auf
den unprogrammierten ³H-dT-Einbau in die DNA nach einer Reparaturzeit von 24 h. n = Anzahl der Versuche.

4.4.3.3. Charakterisierung der UDS

Um die im vorhergehenden Versuch festgestellte Stimulation der UDS näher zu bestimmen, wurden die 24 h nach Röntgenbestrahlung unter UDS-Bedingungen aufgearbeiteten Hepatozyten mit den Reparaturhemmstoffen araC (1 µg/ml) bzw. ddT (25 µg/ml) vorinkubiert. Dabei ging man von der Annahme aus, daß eine reparaturbedingte Stimulation der UDS von diesen Agenzien gehemmt werden müßte. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl die araC- (92,9 %) als auch die ddT-inkubierten Leberzellen (100,8%) unterschieden sich kaum von den ³H-dT-Einbausraten hemmstofffreier, ebenfalls röntgenbestrahlter Hühnerembryonen (100 %), die gegenüber den Unbestrahlten erwartungsgemäß wieder eine deutliche Stimulation der UDS um das eineinhalbfache aufwiesen (nicht eigens dargestellt).

4.4.4. Einfluß fraktionierter Bestrahlung auf die SDS in Abhängigkeit von der Reparaturzeit

Die Hühnerembryonen wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 0,5 bzw. 2 Gy bestrahlt und nach einer Reparaturzeit von 3 bzw. 24 h nach der letzten Exposition am 15.

Tag ihrer Entwicklung aufgearbeitet.

4.4.4.1. SDS nach einer Reparaturzeit von 3 h

Während 3 h nach einer akuten Einzelbestrahlungsdosis von 8 bzw. 4 Gy (vgl. 4.4.1.1. und 4.4.1.2.) eine ausgeprägte Beeinträchtigung der SDS zu beobachten war, bewirkte eine Fraktionierung der Dosen auf $4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy nach einer Reparaturzeit von 3 h eine Veränderung des ^3H -dT-Einbaues auf 91,7 % bzw. 119,1 % gegenüber den scheinbestrahlten Kontrollen (100 %).

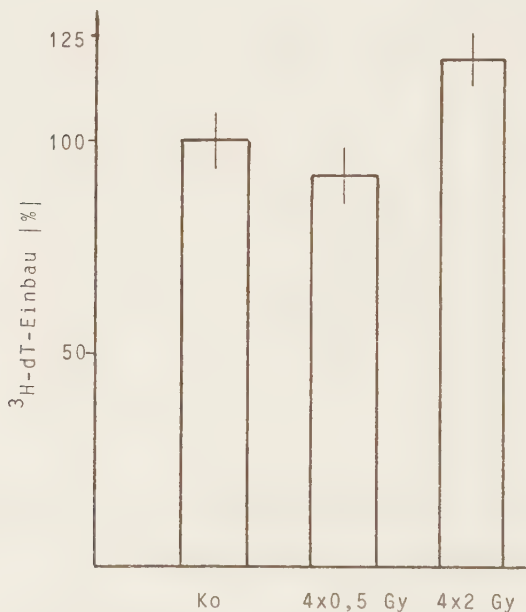


Abb. 4.4.4.1. Einfluß einer fraktionierten Röntgenbestrahlung mit $4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau in die DNA nach einer Reparaturzeit von 3h.

4.4.4.2. SDS nach einer Reparaturzeit von 24 h

24 h nach fraktionierter Bestrahlung mit Dosen von $4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy je Fraktion (Abb. 4.4.4.2.) erreichte der semikonservative ^3H -dT-Einbau in die DNA eine Höhe von 79,2 bzw. 81,2 % der scheinbestrahlten Kontrollen (100 %).

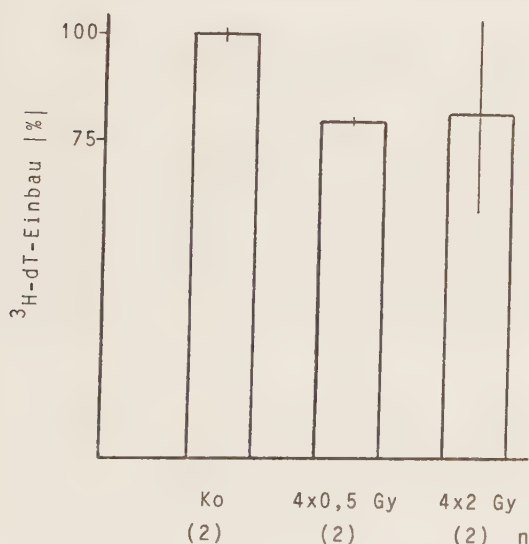


Abb. 4.4.4.2. Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung mit $4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau in die DNA nach einer Reparaturzeit von 24 h. n = Versuche

4.4.5. Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung auf die UDS in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in vivo

Analog zu den vorhergegangenen Versuchen (vgl. 4.4.3. und 4.4.4.) wurde der Einfluß fraktionierter Bestrahlung an 4 aufeinanderfolgenden Tagen ($4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy) auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in die DNA nach Reparaturzeiten von 3 und 24 h untersucht.

4.4.5.1. UDS nach einer Reparaturzeit von 3 h

3 h nach der letzten Exposition waren bei beiden Strahlendosen kaum Unterschiede zu den unbestrahlten Kontrollen (100 %) meßbar (Abb.4.4.5.1.). Eine Dosis von $4 \times 0,5$ Gy zog eine unprogrammierte ^3H -dT-Einbaurrate von 90,8 %, eine Dosis von 4×2 Gy eine solche von 100,5 % nach sich.

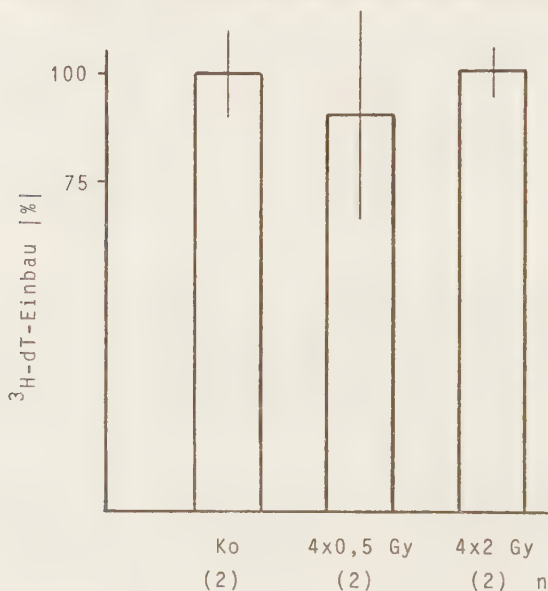


Abb. 4.4.5.1. Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung mit $4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in die DNA nach einer Reparaturzeit von 3 h.

n = Anzahl der Versuche.

4.4.5.2. UDS nach einer Reparaturzeit von 24 h

Ähnlich dem vorhergehenden Versuch treten 24 h nach der letzten Bestrahlungsfraction ($4 \times 0,5$ bzw. 4×2 Gy) kaum Unterschiede im unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in die DNA zu den unbestrahlten Kontrollen (100 %) auf (Abb. 4.4.5.2.). Die niedrigere Strahlendosis bewirkt eine Einbaurrate von 95,2 %, die höhere eine Einbaurrate von 95,0 %.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich damit deutlich von den Ergebnissen einer akuten Einzelbestrahlung (vgl. Abb. 4.4.3.2.).

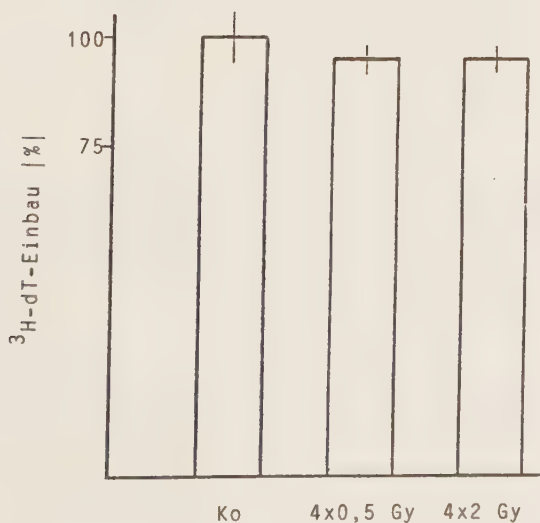


Abb. 4.4.5.2. Einfluß fraktionierter Röntgenbestrahlung mit ³
4 x 0,5 bzw. 4 x 2 Gy auf den unprogrammierten H-dT-Einbau
in die DNA nach einer Reparaturzeit von 24 h.

4.5. In vivo-Einfluß von Agenzien auf die SDS

In den folgenden Versuchen sollte zunächst die Übertragbarkeit der in vitro-Versuche auf das in vivo-Modell Hühnerembryo unter Berücksichtigung einer einfachen Applikationstechnik getestet werden. Dazu wurden die Agenzien über die Luftpumme auf die innere Schalenhaut injiziert (23). Die in vivo-Wirkung chemischer Substanzen wurde in einer Konzentration getestet, die in vitro die semikonservative DNA-Synthese beeinflußt hatte. Abschließend wurden in vivo-Kombinationsversuche von Hemmstoffen der DNA-Synthese und Röntgenbestrahlung durchgeführt.

4.5.1. Methansulfonsäuremethylester (MMS)

In Anlehnung an Hamilton (27) wurde zunächst die Wirkung von MMS auf die SDS 3 und 24 h nach Applikation untersucht. Dazu wurde MMS in einer Konzentration von 3×10^{-3} Mol/l Eivolumen über die Luftpumme auf die innere Schalenhaut injiziert. Diese Konzentration entspricht der in vitro ermittelten DE₅₀ (s.4.3.3.1.). 3 h später wurden die Hühnerembryonen aufgearbeitet und die SDS der Leberzellen gemessen (Abb. 4.5.1.). Dabei wurde eine ³H-dT-Einbaurrate

von 54,3 % gegenüber den scheinbehandelten Kontrollen festgestellt, was sich nur unwesentlich von der in vitro ermittelten DE unterscheidet. 24 h nach Applikation von MMS war die Einbaurrate gegenüber den Vergleichswerten zu rund Zweidritteln gehemmt.

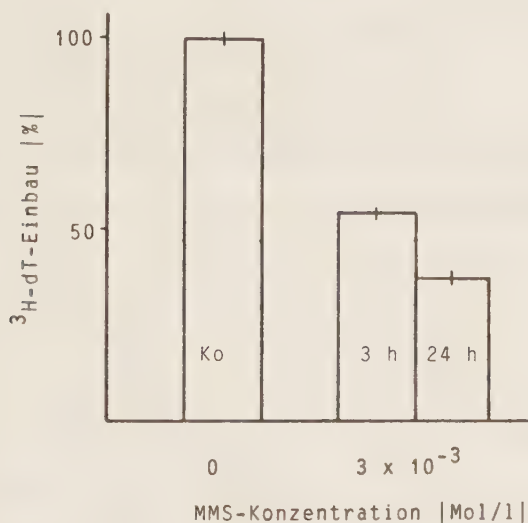


Abb. 4.5.1. Einfluß von 3×10^{-3} Mol MMS/l Eivolumen in vivo auf den semikonservativen ³H-dT-Einbau in die DNA 3 und 24 h nach Applikation in ovo.

4.5.2. 1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC)

Da araC im in vitro-Versuch eine ausgeprägte Wirkung auf die SDS gezeigt hatte, wurde auch die in vivo-Wirkung dieser Substanz überprüft (Abb.4.5.2.). Dazu wurde die ^3H -dT-Einbaurrate in die DNA 3 und 24 h nach Applikation von 0,1, 1 und 10 μg araC/ml Eivolumen gemessen. Während sich nach 3 h bei allen Konzentrationen eine 15 - 20%ige Hemmung andeutete, war nach 24 h bei den Konzentrationen 1 (143,1 %) und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (140,0%) eine Stimulation des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA gegenüber den scheinbehandelten Kontrollen festzustellen.

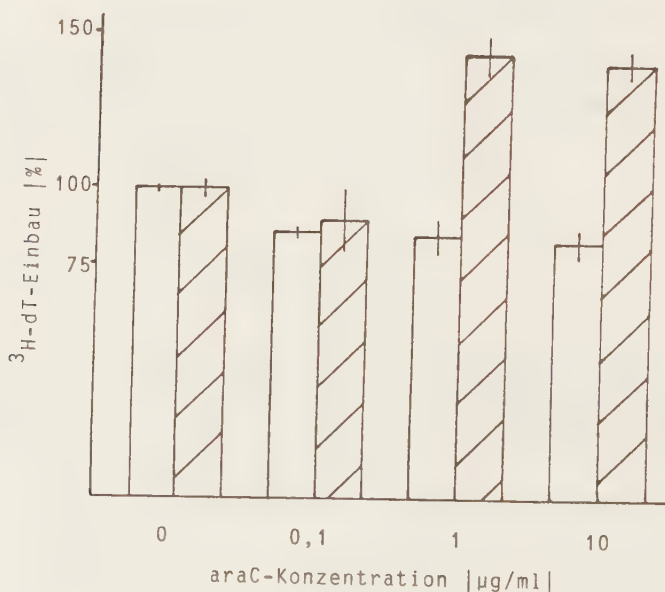


Abb. 4.5.2. Einfluß von *araC* in vivo auf den semi-
3 konservativen H-dT-Einbau in die DNA 3 h (helle Säulen) und
24 h (schraffierte Säulen) nach Applikation in ovo.

4.6. Interaktionen in vivo zwischen Hemmstoffen der DNA- Synthese und Röntgenbestrahlung

Ausgehend von den vorangegangenen Versuchen wurde die in vivo-Wechselwirkung zwischen den DNA-Synthesehemmstoffen 1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (*araC*), 2',3'-Dideoxythymidin (*ddT*) oder 3-Aminobenzamid (3-AB) und Röntgenbestrahlung getestet. Dazu wurden die jeweiligen Agenzien über die Luftkammer auf die innere Schalenhaut injiziert. 3 h später wurden die Eier mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Nach 24 h erfolgte die Aufarbeitung der behandelten bzw. scheinbehandelten Hühnerembryonen. Wie unter 4.4.1.1. beschrieben, bewirkte zu diesem Zeitpunkt eine Dosis von 8 Gy kaum noch eine Hemmung der SDS, jedoch eine deutliche Stimulation der UDS (s. 4.4.3.2.).

4.6.1. araC und Röntgenbestrahlung

4.6.1.1. Einfluß auf die SDS

araC wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml Eivolumen injiziert.

Während sich 24 h (helle Säulen) bzw. 36 h (schraffierte Säulen) nach Bestrahlung die exponierten Embryonen (93,4%) erwartungsgemäß kaum noch von den scheinbehandelten (100 %) unterscheiden, reduziert die Kombination von araC und Röntgenbestrahlung erheblich die durch araC alleine hervorgerufene Stimulation des semikonservativen ³H-dT-Einbaues in die DNA (Abb. 4.6.1.1.). Die araC-stimulierte, unbestrahlte Einbaurrate beträgt nach 24 h 162,5 %, die Kombination von araC und Röntgenbestrahlung 106,2 %. Nach einer Reparaturzeit von 36 h ist dieser Effekt genauso deutlich (³H-dT-Einbauraten von 135,5 % bis 75,2 %).

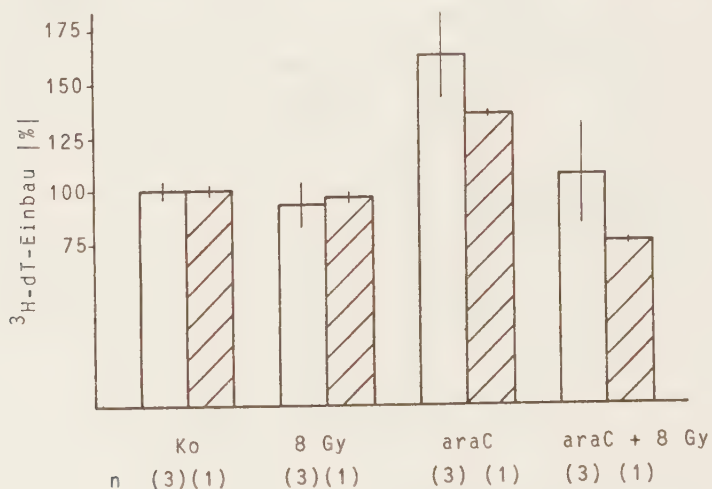


Abb. 4.6.1.1. Interaktion in vivo von araC und Röntgenbestrahlung. 3 h nach Applikation von 1 µg araC/ml Eivolumen in ovo Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy. Bestimmung des semikonservativen ³H-dT-Einbaues in die DNA 24 h (helle Säulen) bzw. 36 h (schraffierte Säulen) nach Bestrahlung. n = Anzahl der Versuche.

4.6.1.2. Einfluß auf die UDS

24 h nach Röntgenbestrahlung mit 8 Gy werden eine unprogrammierte ³H-dT-Einbaurrate von 199,8 % erreicht und die Ergebnisse von 4.4.3.2. damit bestätigt.

Überraschenderweise löst die alleinige Applikation von 1 µg araC/ml Eivolumen ebenfalls eine Stimulation aus (228,9 %). In orientierenden Versuchen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung dieses Effektes blieben 0,5 µg araC/ml Eivolumen ohne Einfluß auf die UDS (104,6 %), während 2 µg araC/ml Eivolumen den unprogrammierten ³H-dT-Einbau auf 341,0 % erhöhten (keine eigene Darstellung). Bei Kombination von araC und Röntgenbestrahlung wurde eine Einbaurrate erzielt, die sich nur wenig von den Einzelwirkungen der Agenzien unterscheidet.

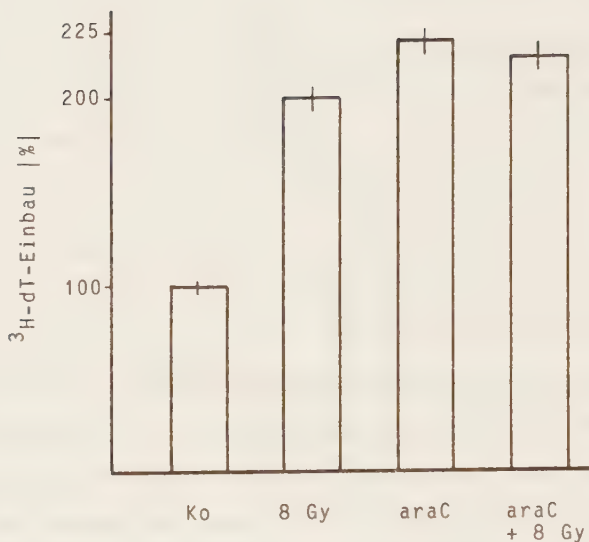


Abb. 4.6.1.2. Interaktion *in vivo* von *araC* und Röntgenbestrahlung. 3 h nach Applikation von 1 µg *araC*/ml Eivolumen Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy. Bestimmung des unprogrammierten ³H-dT-Einbaues in die DNA 24 h nach Bestrahlung.

4.6.1.3. Charakterisierung der UDS

Analog zu 4.4.3.3. sollte die oben beobachtete Stimulation der UDS der *araC* behandelten Hühnerembryonen näher charakterisiert werden.

24 h nach *araC*-Applikation *in vivo* wurden die Hepatozyten unter UDS-Bedingungen aufgearbeitet und mit den Reparatur-

hemmstoffen araC bzw. ddT vorinkubiert. Dabei kam es zu keiner ausgeprägten Hemmung des folgenden ³H-dT-Einbaues in die DNA (nicht eigens dargestellt).

4.6.1.4. Einfluß auf den endogenen Thymidinpool

Um Einflüsse der Kombination von araC (1 µg/ml Eivolumen) und Röntgenbestrahlung (8 Gy) auf den endogenen Thymidinpool nach einer Reparaturzeit von 24 h auszuschließen, wurden den entsprechenden Leberzellsuspensionen während einer 30minütigen Vorinkubation 8 µg Desoxythymidin (dT)/ml zugesetzt. Mit einer Einbaurrate von 53,1 % gegenüber der dT-freien Leberzellsuspension (100 %) wurde die in früheren Versuchen (4.1.6.) ermittelte DE bestätigt (Abb. 4.6.1.4.).

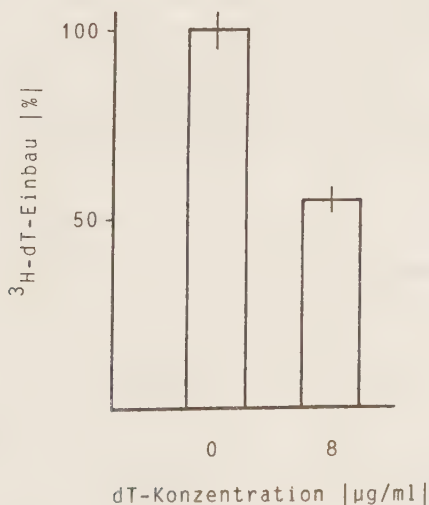


Abb. 4.6.1.4. Prozentuale Hemmung des semikonservativen ³H-dT-Einbaues in die DNA durch 8 µg dT/ml in der Vorinkubation. Einfluß der Kombination von 1 µg araC/ml Eivolumen und einer Röntgendosis von 8 Gy auf den endogenen Thymidinpool nach 24 h.

4.6.2. ddT und Röntgenbestrahlung - Einfluß auf die SDS

Eine Konzentration von 10 µg ddT/ml Eivolumen (helle Säulen) in Kombination mit Röntgenbestrahlung (76,6 %) zeigte nach 24 h kaum Unterschiede zu den ddT-freien, röntgenbestrahlten Hühnerembryonen (76,2 %).

Bei einer ddT-Konzentration von 22 µg/ml Eivolumen dagegen (schraffierte Säulen) tritt 24 h nach Bestrahlung eine deutliche Interaktion auf: Der semikonservative ³H-dT-Einbau in die DNA sinkt auf 42,1 %, während die ddT-freien, röntgenbestrahlten Hühnerembryonen mit einer Einbaurrate von 78,5 % nahe an die scheinbehandelten Kontrollen (100 %) heranreichen.

Weitere Versuche, insbesondere mit höheren ddT-Konzentrationen, waren wegen der hohen Kosten dieser Substanz nicht mehr durchführbar.

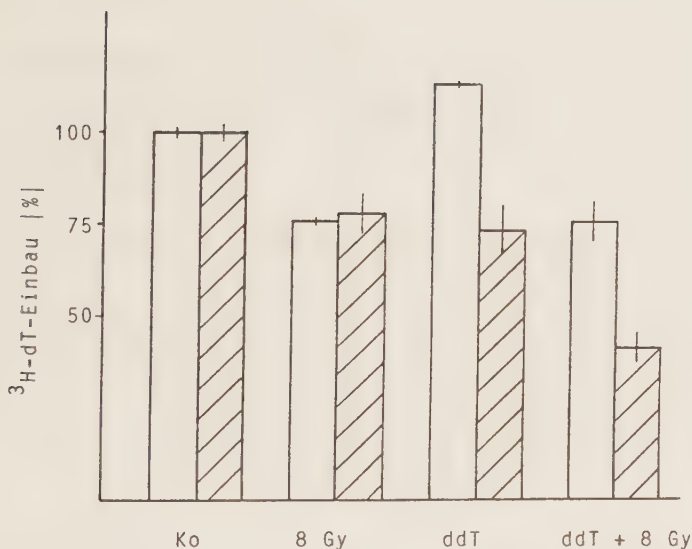


Abb. 4.6.2. Interaktion *in vivo* von ddT und Röntgenbestrahlung. 3 h nach Applikation von 10 (helle Säulen) bzw. 22 µg ddT/ml Eivolumen (schraffierte Säulen) *in ovo* Röntgenbestrahlung mit 8 Gy. Bestimmung des semikonservativen ³H-dT-Einbaues in die DNA 24 h nach Bestrahlung.

4.6.3. 3-AB und Röntgenbestrahlung - Einfluß auf die SDS

3-AB wurde in einer Konzentration von 0,1 mMol/l Eivolumen *in ovo* appliziert.

In dieser (und geringerer) Konzentration wird dem "Reparaturhemmstoff" 3-AB *in vitro* in jüngster Zeit (10) ein

stimulierender Effekt auf den Reparaturablauf zugeschrieben. Die in eigenen in vitro-Versuchen (vgl. 4.3.6.2.) ebenfalls festgestellte Tendenz einer Stimulation bestätigte sich auch in vivo (Abb. 4.6.3.). 24 h nach Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy war der semikonservative ^3H -dT-Einbau bei den 3-AB behandelten Embryonen gegenüber den scheinbehandelten Kontrollen (100 %) um rund 25 % erhöht, während die 3-AB-freien, röntgenbestrahlten Hühnerembryonen mit 92,2 % nahezu ausgeglichene Verhältnisse zeigten. Die Applikation von 0,1 mMol 3-AB/l alleine bewirkte eine Einbaurrate von 115,4 %.

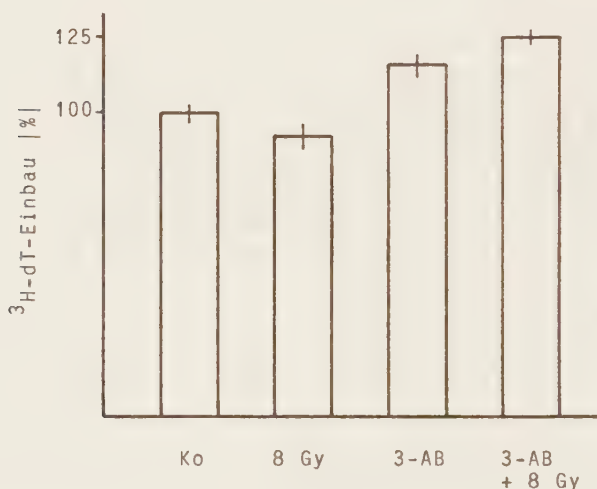


Abb. 4.6.3. Interaktion *in vivo* von 3-AB und Röntgenbestrahlung. 3 h nach Applikation von 0,1 mMol 3-AB/1 Eivolumen *in ovo* Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy. Bestimmung des semikonservativen ³H-dT-Einbaues in die DNA 24 h nach Bestrahlung.

4.7. Nukleoidsedimentation

4.7.1. Einfluß von Röntgenbestrahlung *in vitro*

Nach *in vitro*-Bestrahlung von 6 Zellreihen mit Dosen von 0, 0,75, 1,5, 3,0, 6,0 und 12,0 Gy (0,75 Gy/min) und unmittelbar anschließender Lyse der Zellen konnten *keine dosisabhängigen Unterschiede* der Sedimentationsstrecken festgestellt werden (Foto 4.7.1.). Zahlreiche Wiederholungsversuche mit z.T. noch höheren Strahlendosen bestätigten dieses Ergebnis. Bereits die unbestrahlten Zellreihen mit intakter DNA waren - verglichen etwa mit Thymus-, Milz- oder Knochenmarkszellen der Ratte - nur wenig sedimentierbar.

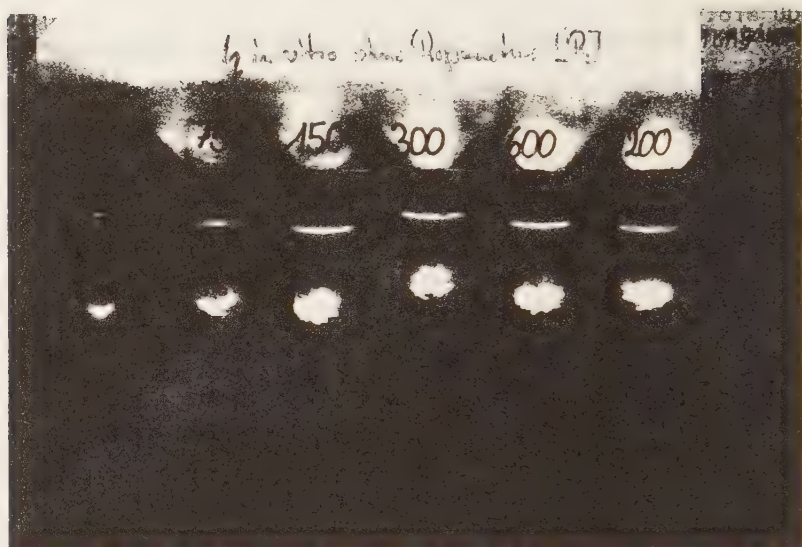


Foto 4.7.1. Einfluß von Röntgenbestrahlung *in vitro* auf die Nukleoidsedimentation in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

4.7.2. Einfluß von Röntgenbestrahlung *in vivo*

Während Strahlendosen von 4 und 8 Gy nach einer Reparaturzeit von 6 h noch eine deutliche Hemmung des semikonservativen ³H-dT-Einbaues hervorriefen (vgl. 4.4.1.1. und 4.4.1.2.), lassen sich mit der Methode der Nukleoidsedimentation vorliegend keine Strahlenschäden nachweisen. Die Sedimentationsstrecken der Leberzellen bestrahlter und unbestrahlter Hühnerembryonen unterscheiden sich nicht (Foto 4.7.2.).

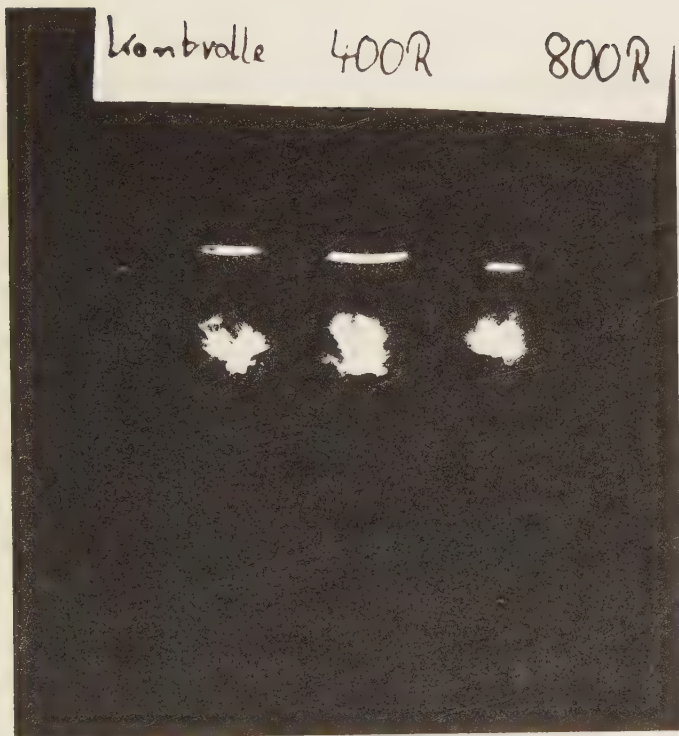


Foto 4.7.2. Einfluß von Röntgenbestrahlung *in vivo* auf die Nukleoidsedimentation. Reparaturzeit von 6 h. Von links nach rechts: unbestrahlte Kontrolle, 4 und 8 Gy.

Auch nach Reparaturzeiten von 3 und 24 h bei gleichen Strahlendosen wiesen die Nukleoide bestrahlter und unbestrahlter Hühnerembryonen gleiche Sedimentationsstrecken auf (nicht eigens dargestellt).

Die Ergebnisse der Nukleoidsedimentation lassen somit darauf schließen, daß diese Methode unter den angegebenen Bedingungen bei Leberzellen des Hühnerembryos *keine Aussagen über Strahlenschädigung* der DNA zuläßt.

5. DISKUSSION

5.1. In vitro-Versuche zur Charakterisierung der Leberzellen

Bereits frühere Untersuchungen beschäftigten sich mit den Wirkungen verschiedener Agenzien auf die semikonservative DNA-Synthese von Milz-, Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte (18,24,76,81,82,83). Einen Vergleich dieser Ergebnisse mit den eigenen erlaubt Tab. 5.1.1.:

Hühnerembryo		Ratte		
Hepatozyten		Thymus	Milz	Knochenmark
Rö	56 Gy	63 Gy	70 Gy	> 64 Gy
UV	32 J/m ²	384 J/m ²	380 J/m ²	128 J/m ²
dT	8 µg/ml	3 µg/ml	9 µg/ml	24 µg/ml
MMS	2,5 mMol/l	0,6 mMol/l	1,4 mMol/l	- *
araC	1,5 µg/ml	0,12 µg/ml	8,7 µg/ml	2,5 µg/ml
ddT	kein Einfluß			- *
3-AB	> 10 mMol/l			- *
HU	⁻¹ 10 Mol/l	⁻² 10 Mol/l	⁻⁴ 5x10 Mol/l	⁻³ 7,8x10 Mol/l
EB	20 µg/ml	<200µg/ml	140 µg/ml	- *
NB	500 µg/ml	1400µg/ml	1000 µg/ml	900 µg/ml
43 °C	60 min	60 min	45 min	40 min

* keine Ergebnisse bekannt

Tab.5.1.1.50%ige Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese. Einfluß von Röntgenstrahlen (Rö), UV-Licht (UV), Desoxythymidin (dT), Methansulfonsäuremethylester (MMS), 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin (araC), Dideoxythymidin (ddT), 3-Aminobenzamid (3-AB), Hydroxyharnstoff (HU), Ethidiumbromid (EB), Novobiocin (NB) und Hyperthermie (43°C) auf Leberzellen des Hühnerembryos sowie Thymus-, Milz- und Knochenmarkszellen der Ratte *in vitro*.

3

Tab.5.1.2. zeigt einen Vergleich der absoluten H-dT-Einbau-
raten in die DNA im Zusammenhang mit der SDS und der un-
stimulierten UDS von Leberzellen des Hühnerembryos mit denen
von Knochenmarks-, Thymus- und Milzzellen der Ratte.
Dargestellt sind sämtliche Mittelwerte der eigenen *in vivo*-
Versuche am Hühnerembryo und Werte früherer Arbeiten an der
Ratte (76, Tempel unveröffentlicht).

	SDS	UDS
Leberzellen Hühnerembryo	2.780 $\pm$ 1.023 n = 35	632 $\pm$ 174 * n = 12
Knochenmarks- zellen Ratte	7.377 $\pm$ 1.265	765 $\pm$ 185
Thymuszellen Ratte	7.857 $\pm$ 1.622	95 $\pm$ 20
Milzzellen Ratte	834 $\pm$ 457	135 $\pm$ 9

* Bei den UDS-Versuchen am Hühnerembryo wurde die 10fache Konzentration an Hydroxyharnstoff verwendet wie bei der Ratte

Tab.5.1.2.: Absolute semikonservative und unstimulierte un-
programmierte ³H-dT-Einbauraten von Leberzellen des Hühner-
embryos sowie Knochenmarks-, Thymus- und Milzzellen der
Ratte; $\text{dpm} \times 10^{-3} \times \text{mg}^{-1}$ DNA. n = Anzahl der Versuche.

Auf den Wirkungsmechanismus der einzelnen Agenzien wurde bereits bei den jeweiligen in vitro-Versuchen eingegangen (4.3.ff). Einen umfassenderen Überblick geben u.a. *Collins et al.* (11,12).

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtigste Unterschied zwischen den Leberzellen des Hühnerembryos und Rattenzellen betrifft die besondere Empfindlichkeit der Embryonalzellen gegenüber UV-Bestrahlung und Ethidiumbromid sowie ihre relative Unempfindlichkeit gegenüber Hydroxyharnstoff (Tab. 5.1.1.). Erstere bedarf weiterer abklärender Versuche, letztere kommt auch in Tabelle 5.1.2. zum Ausdruck:

Trotz 10facher HU-Konzentration werden bei den UDS-Versuchen³ an Hepatozyten des Hühnerembryos H-dT-Einbauraten erzielt, die weit über denen von Thymus- und Milzzellen liegen und nahe an die von Knochenmarkszellen heranreichen.

Dies könnte einerseits der Ausdruck einer Veränderung des endogenen Thymidintriphosphatpools durch HU sein, andererseits auch auf einer hohen Aktivität der, durch HU inaktivierbaren, Ribonukleotidreduktase in den Hepatozyten des Hühnerembryos beruhen. Beides würde erklären, warum die semikonservative DNA-Synthese erst durch relativ hohe HU-Konzentrationen gehemmt wird.

Wie unter 3.3.4. ausführlich erläutert, kann eine Substanz den endogenen DNA-Vorstufenpool der Zelle verändern. Eine *Expansion* des endogenen Thymidintriphosphatpools bewirkt³ eine Verdünnung der radioaktiv markierten DNA-Vorstufe H-dT

und damit *verminderte Einbauraten* in die DNA. Eine *Kontraktion* des endogenen Thymidintriphosphatpools dagegen führt zu einem *erhöhten Einbau* des Tracers in die DNA.

Zahlreiche Autoren haben an den verschiedensten Zelllinien von Säugetieren den Einfluß von HU auf den endogenen DNA-Vorstufenpool untersucht (14,65,89,100,102,103,105).

Demzufolge bewirkte HU zwar eine *Kontraktion* des endogenen *Purinnucleotidpools*, gleichzeitig jedoch eine *Expansion* des *Pyrimidinnucleotidpools* und hier insbesondere des *Thymidintriphosphatpools*. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die relative HU-Unempfindlichkeit der Hepatozyten des Hühnerembryos die Folge einer Verkleinerung des Thymidintriphosphatpools ist und dadurch - verglichen mit den Zellen der Ratte - über eine endogen geringere Verdünnung des Tracers bei gleicher HU-Konzentration höhere ³H-dT-Einbauraten in die DNA bewirkt werden.

Collins und Oates (14) testeten jüngst ebenfalls an verschiedenen Zelllinien den Einfluß von HU auf den DNA-Vorstufenpool. Es ergab sich u. a., daß die *Poolgröße* von Zellart zu Zellart beachtliche Unterschiede aufweisen kann. Geht man von dieser Feststellung aus, würden die Hepatozyten des Hühnerembryos über einen großen, erst durch hohe HU-Konzentrationen beeinflussbaren DNA-Vorstufenpool, insbesondere Thymidintriphosphatpool, verfügen. Dies wird jedoch durch die über die Isotopenverdünnungsanalyse unter SDS-Bedingungen (vgl. 4.1.6.) erhaltenen Ergebnissen nicht gestützt (s. Tab. 5.1.1.).

Die Beobachtungen anderer Autoren lassen demgegenüber den Schluß zu, daß die HU-Unempfindlichkeit der Hepatozyten des Hühnerembryos im Vergleich mit Zellen der Ratte auf einer hohen Ribonukleotidreduktase-Aktivität beruht. Reichard (105) beispielsweise wies nach, daß im Ruhestadium befindliche Säugetierzellen nur geringe oder keine Ribonukleotidreduktase-Aktivitäten besitzen. Nach Stimulation der DNA-Synthese kam es zu einem dramatischen Anstieg dieses Enzyms, so daß in S-Phase-Zellen die höchsten Aktivitäten feststellbar waren. Leeds et al. (104) beobachteten in S-Phase-Zellen die zehnfache Aktivität an Ribonukleotidreduktase verglichen mit G₁-Phase-Zellen. Cory und Sato (101) stellten darüberhinaus allgemein fest, daß in Geweben von Säugetieren mit hohen Proliferationsraten die höchsten Konzentrationen an Ribonukleotidreduktase zu finden sind. Davon ausgehend ist anzunehmen, daß die teilungsaktiven Hepatozyten des Hühnerembryos über hohe Ribonukleotidreduktase-Aktivität verfügen und deshalb relativ unempfindlich auf HU reagieren.

Unter dem Gesichtspunkt der quantitativen Erfassung der DNA-Reparatursynthese nicht unproblematisch ist die in den UDS-Versuchen somit notwendigerweise verwendete relativ hohe HU-Konzentration. In Konzentrationen $\geq 10^{-6}$ Mol/l soll HU hemmend in den Reparaturmechanismus eingreifen (11,20,90) und eine oxidative Eigenwirkung auf die DNA entfalten (2,16).

Auf die Problematik der Stimulation der UDS 24 h nach Röntgenbestrahlung bzw. araC-Applikation in vivo wird unter 5.3. eingegangen.

5.2. Röntgenstrahlenexposition in vivo

Die auffälligsten Ergebnisse der Röntgenstrahlenexposition in vivo lassen sich, wie folgt, zusammenfassen:

- Während die semikonservative DNA-Synthese 3 Stunden nach Einwirkung einer einmaligen Strahlendosis stark *gehemmt* ist, erscheint sie nach einer Reparaturzeit von 24 h nahezu *ausgeglichen*.

Die gleiche Strahlendosis, jedoch *fraktioniert*, zeigt zu beiden genannten Zeiten *kaum Auswirkungen*.

- Noch 24 h nach einer einmaligen Strahlenexposition ist eine extreme Stimulation der durch Hydroxyharnstoff *gehemmten* DNA-Synthese (UDS) feststellbar.

Die gleiche Strahlendosis, jedoch *fraktioniert*, hatte keine signifikanten Effekte.

Folgende Möglichkeiten einer Erklärung bieten sich an:

1. Der Hühnerembryo verfügt über ein besonders wirkungsvolles subzelluläres Reparatursystem.
2. Das embryonale Lebergewebe weist eine so hohe zelluläre bzw. gewebliche Regenerationsfähigkeit auf, daß selbst relativ hohe Strahlendosen toleriert werden.

Beide Mechanismen - intensive subzelluläre DNA-Reparatur und hohes zelluläres Regenerationsvermögen - könnten erklären, warum bereits 24 h nach Strahlenexposition mit Dosen nahe der LD₅₀ ein allgemein so empfindlicher Parameter wie die semikonservative DNA-Synthese nahezu ausgeglichen erscheint.

Als zelluläres Phänomen könnte das hohe Zellteilungsvermögen des embryonalen Gewebes die schnelle Regeneration ermöglichen. Stevens (79) beispielsweise stellte beim etwa 13 Tage alten Hühnerembryo eine DNA-Umsatzrate von 116 % /24 h fest, während der DNA-Umsatz beim adulten Kaninchen vergleichsweise nur 4 % betragen soll.

In diesem Zusammenhang ist auch an Zellersatzreparatur in Verbindung mit programmierten Zelltod (Apoptosis) zu denken. In einer neuesten Arbeit weist zum Beispiel Kondo (41) darauf hin, daß noch weitgehend undifferenzierte, teilungsaktive Embryonalzellen auf Strahlenschäden mit Zell-Selbstmord zum Wohle des Gesamtorganismus' reagieren können. Als Folge werden die Proliferation ungeschädigter pluripotenter Zellen stimuliert und die apoptotisch zugrundegegangenen Zellen ersetzt.

Endgültig können zelluläre Phänomene letztlich nur histologisch und autoradiographisch erfasst werden (vgl. dazu aber Stearner und Sanderson, S. 110 f).

Dem möglichen Anteil subzellulärer Reparaturmechanismen an der Strahlenresistenz der Hepatozyten des Hühnerembryos dienten Hemmstoffversuche.

Die Verwendung von DNA-Synthese-Hemmstoffen gilt als anerkannte Methode, die Beteiligung einzelner, am Reparaturvorgang beteiligter Enzyme und das Reparaturvermögen insgesamt zu erfassen (8,10,12,33,71). *Miller und Chinault* (52) beispielsweise bestätigten so, daß die Aktivität der DNA-Polymerasen α oder β im Reparaturgeschehen vom Schadenstyp und vom Schadensausmaß abhängt. In zahlreichen Arbeiten wird in gleicher Weise die spezifische Antwort der DNA-Polymerasen auf bestimmte Noxen an der DNA hervorgehoben (9, 11,34,55,71).

Auch die eigenen Ergebnisse zur Interaktion zwischen Hemmstoffen der DNA-Synthese und Röntgenbestrahlung *in vivo* sprechen dafür, daß der Hühnerembryo über ein besonders wirkungsvolles subzelluläres Reparatursystem verfügt. Nach Hemmung der DNA-Polymerase β - dem Enzym wird bei der Reparatur röntgenstrahleninduzierter DNA-Schäden (Kurzstrangexcision) entscheidende Bedeutung zugemessen - durch ddT und darauffolgender Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy blieben 24 h später die semikonservativen ³H-dT-Einbausraten in die DNA deutlich hinter jenen der ddT-freien, ebenfalls bestrahlten Hühnerembryonen zurück (vgl. 4.6.2.). Ähnliches gilt für die Wechselwirkung araC/Röntgenbestrahlung (vgl. 4.6.1.1.). araC hemmt neben der DNA-Polymerase α unspezifisch auch die DNA-Polymerase β . Damit deutet sich an, daß die DNA-Polymerase β auch beim Hühnerembryo für die Reparatur röntgenstrahleninduzierter DNA-Schäden von wesentlicher Bedeutung ist.

Die Annahme, daß der Hühnerembryo über ein besonders ausgeprägtes subzelluläres Reparatursystem verfügt, wird auch von den Beobachtungen anderer Autoren gestützt. *Liebecq-Hutter et al.* (47) beispielsweise bestrahlten Fibro- und Myoblasten des Hühnerembryos *in vitro* mit einer Dosis von 103,2 mC/kg während verschiedener Zellzyklusphasen - vor der DNA-Synthese (G¹-Phase), während der DNA-Synthese (S-Phase), nach der DNA-Synthese (G²-Phase) sowie während der Mitose - und bestimmten histoautoradiographisch den H-dT-Einbau in die DNA. Unabhängig von der periodischen Aktivität der Enzyme während der DNA-Synthese und der damit verbundenen H-dT-Incorporation in die DNA kam es vor und nach der DNA-Synthese zu unerwartet hohem H-dT-Einbau. Die Autoren schließen daher auf ein *Enzymarsenal*, das von der normalen DNA-Synthese abweicht und Ursache eines besonders wirkungsvollen Reparatursystems sein soll, was auch die besondere Strahlenresistenz des Huhnes erklären könnte.

Petrovic und Kanazir (62) exponierten Hühnerembryonen am 11. Tag der Entwicklung einer Röntgenstrahlendosis von 103,2 mC/kg und applizierten ihnen 24 oder 5 h vor dem 15. Entwicklungstag, dem Zeitpunkt der Aufarbeitung, C-¹⁴Orotsäure. Es ergab sich u.a., daß die Markierung der DNA bestrahlter Hühnerembryonen weit über der unbestrahlter Kontrollen lag. *Stearner und Sanderson* (77) bestrahlten 3 Wochen alte Küken u.a. mit Dosen von 0,309 bzw. 0,1806 C/kg einmalig innerhalb von 15 min und über 24 h protrahiert mit einer Dosis von 2,58 C/kg. Die Mortalität der mit 0,309 C/kg bestrahlten

Tiere belief sich innerhalb von 24 h auf über 70 % und war - elektronenmikroskopisch - durch zahlreiche Zelluntergänge im Bereich des Gefäßsystems gekennzeichnet. In deutlichem Gegensatz dazu belief sich die Mortalität der mit einer Dosis von 0,1806 C/kg bestrahlten Küken lediglich auf < 5 % und die der mit einer Dosis von 2,58 C/kg bestrahlten Tiere auf etwa 10 %. Elektronenmikroskopisch waren bei den beiden letztgenannten Gruppen nur geringfügige ultrastrukturelle Veränderungen nachweisbar, die sich kaum voneinander unterschieden. Auch diese Autoren sehen die Erklärung ihrer Ergebnisse im Ablauf besonders wirkungsvoller intrazellulärer Reparaturprozesse.

Die in vorliegender Arbeit beobachtete Stimulation der UDS 24 h nach Röntgenbestrahlung würde - oberflächlich betrachtet - ebenfalls für noch ablaufende, ausgeprägte Reparaturvorgänge sprechen. Diese UDS ließ sich jedoch durch Reparaturhemmstoffe nicht in nennenswertem Umfang beeinflussen (vgl. 4.4.3.2.). Darüberhinaus widerspricht der Zeitpunkt der Stimulation der Tatsache, daß 24 h nach röntgenstrahleninduzierten DNA-Schäden keine über die UDS erfaßbaren Reparaturvorgänge mehr ablaufen (45). Es ist somit unwahrscheinlich, daß mit der gemessenen UDS-Stimulation 24 h nach Exposition tatsächlich subzelluläre Reparaturvorgänge erfaßt wurden. Auf diese Problematik wird im Zusammenhang mit der auch nach araC-Applikation festgestellten UDS-Stimulation (vgl. 4.6.1.3.) im folgenden Abschnitt eingegangen.

5.3. araC-Wirkungen

Während die in vitro-Versuche mit araC (vgl. 4.3.4.) den Charakter der Substanz als hochwirksamer Hemmstoff der semikonservativen DNA-Synthese bestätigten, erbrachten die in vivo-Versuche scheinbar das Gegenteil (vgl. 4.5.2. und 4.6.1.1.): In vitro bewirkte 1 µg araC/ml eine 57,4 %ige Hemmung der SDS, in vivo stimulierte die gleiche Konzentration je ml Eivolumen (insgesamt 40 µg araC/Ei) den H-dT-Einbau in die DNA auf 143,1 % . Diese pro Ei applizierte araC-Menge liegt um mehr als das 10 - 20fache unter der LD₅₀, die Karnofsky (38) (mit 500 - 1000 µg je Ei) für den 12 Tage alten Hühnerembryo ermittelte. Da der Autor eine direkte Korrelation zwischen dem steigenden Gewicht des Embryos und der LD₅₀ von araC feststellte, kann davon ausgegangen werden, daß die LD₅₀ für den in den vorliegenden Versuchen verwendeten 15 Tage alten Hühnerembryo noch höher anzusetzen ist.

Parallel zum Anstieg der SDS ist auch eine Stimulation der UDS beobachtbar (vgl. 4.6.1.2), die sich nur wenig von der unprogrammierten H-dT-Einbaurrate nach Röntgenbestrahlung bzw. nach Kombination von araC und Röntgenbestrahlung unterscheidet. Die Stimulation der SDS und/oder UDS durch araC bzw. Röntgenbestrahlung war weder durch DNA-Reparatur-Hemmstoffe (vgl. 4.6.1.3.) nachhaltig zu beeinflussen noch über Einflüsse auf den endogenen Thymidinpool erklärbar (vgl. 4.6.1.4.).

Ein analoges Phänomen nach araC-Einwirkung beschreiben u.a. Woodcock et al. (94,95,96): Bei in vitro-Versuchen mit verschiedenen Zelllinien des Menschen und des Chinesischen Hamsters beobachteten die Autoren zunächst ebenfalls eine Hemmung der DNA-Synthese durch araC. Nach Aufhebung dieser Hemmung, so Woodcock et al., werde die DNA-Synthese erneut gestartet, und zwar auch an DNA-Segmenten, die bereits vor dem Hemmeinfluß von araC in der S-Phase repliziert worden seien. Dies führe schließlich zur doppelten Replikation - *overreplication* - einiger DNA-Segmente.

Als Ursache für diese *overreplication* kommt die Störung des Mechanismus' in Betracht, der normalerweise den Startprozeß der Replikation chromosomaler DNA kontrolliert und sicherstellt, daß jedes DNA-Segment nur einmal in jedem Zellzyklus repliziert wird. Dies bewirke eine mindestens zweimalige Replikation einiger DNA-Segmente in einer einzigen S-Phase. Der erneute Start der DNA-Synthese an bereits früher replizierten Segmenten ist offenbar keine Eigenheit des araC-Moleküls, sondern eine sekundäre Folge der Unterbrechung der DNA-Synthese überhaupt; araC soll dabei jedoch nicht den DNA-Reparatursynthesetyp auslösen, der von physikalischen Läsionen induziert wird.

Mit dieser *overreplication* verbunden ist die unkontrollierte Vermehrung einander entsprechender Gene, *gene amplification* genannt.

Hahn et al.(25) und Morgan et al. (54) postulieren einen anderen Mechanismus der DNA-*overreplication* und der daraus

resultierenden *gene amplification*. Im Gegensatz zu Woodcock et al. wiesen sie (ebenfalls an Zellen des Chinesischen Hamsters) nach, daß es nicht in einer einzigen S-Phase, sondern erst im darauffolgenden Zellzyklus zur *overreplication* kommt. Der Chromosomenschaden, hier mit Hydroxyharnstoff induziert, lasse viele S-Phase-Zellen absterben. Unter den Überlebenden seien Zellen mit Chromosomenaberrationen. Kleine Chromosomenfragmente könnten fortbestehen und über Generationen hinweg, insbesondere unter Selektionsdruck, repliziert werden. Bei asymmetrischer Verteilung der Fragmente trete im folgenden Zellzyklus eine entsprechende Genvermehrung auf, gefolgt von einer Selektion der Zellen.

Auch andere Auslösefaktoren für den Vorgang der *overreplication* sind bekannt, beispielsweise UV-Bestrahlung, 9- β -Arabinofuranosyladenin und Cycloheximid (95).

Selbst die spezielle *Amplifikation* bestimmter Gene wird beschrieben. Wright et al. (97) z.B. konnten nachweisen, daß die Entwicklung hydroxyharnstoffresistenter Zelllinien von Hamster, Maus, Ratte und Mensch von einer Amplifikation des Ribonukleotidreduktasegenes begleitet werden. Lücke-Huhle et al. (48) stellten selektive Gen-Vermehrung bei virus-transformierten (SV 40) Embryonalzellen des Chinesischen Hamsters nach UV-Licht, sowie alpha- und gamma-Bestrahlung fest. Alle Strahlenarten induzierten dosis- und zeitabhängig eine 15 - 25fache Vermehrung der spezifischen SV 40-Virusfrequenzen.

Die *overreplication* spezifischer DNA-Segmente wird als allgemeine Antwort auf DNA-schädigende Agenzien angesehen, unabhängig davon, ob sie Einzel- und Doppelstrangbrüche oder Basenschädigung der DNA bewirken.

Es liegt daher die Annahme nahe, daß *araC* eine *overreplication* der DNA der Leberzellen des Hühnerembryos bewirkt. Gleiches ist auch für die Ergebnisse der Strahlenexposition *in vivo* und die Kombinationsversuche *araC*/Röntgenbestrahlung, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, denkbar.

Einhergehend mit einer generellen Gen-Amplifikation, ausgelöst durch *araC* bzw. Röntgenbestrahlung, kann es u. a. zu einer Vermehrung von Ribonukleotidreduktasegenen kommen. Die beobachteten erhöhten unprogrammierten³ H-dT-Einbauraten, die von anderen Autoren auch als nicht-hydroxyharnstoff-hemmbarer Anteil der SDS bezeichnet werden, täuschen somit lediglich Reparaturabläufe vor. Stattdessen scheinen vermehrt hydroxyharnstoffresistente Zellen entstanden zu sein, die dementsprechend gegenüber den unbehandelten, und daher hydroxyharnstoffhemmbaren Kontrollen unter UDS-Bedingungen höhere³ H-dT-Einbauraten aufweisen.

Ähnliche Beobachtungen beschrieben auch *Hollatz und Tempel* (33), die u.a. die Wirkungen von Ganzkörperröntgenbestrahlungen (10 Gy) auf die UDS von Milzzellen der Ratte untersucht hatten. Unmittelbar bis etwa 16 h nach Strahlenexposition hatte sich eine Depression des nicht hydroxy-

harnstoffhemmbaren ³H-dT-Einbaues in die DNA ergeben, 24 und 72 h später jedoch kam es ebenfalls zu einer Stimulation des ³H-dT-Einbaues von 150% gegenüber den scheinbestrahlten Kontrollen.

Abschließend soll die Tatsache nicht unerwähnt bleiben, daß die Mechanismen der *DNA-overreplication* und der daraus resultierenden Gen-Amplifikation noch weitgehend ungeklärt sind. *Painter et al.* (58) beispielsweise stellen die eingangs beschriebenen Ergebnisse *Woodcocks et al.* wieder infrage, da die induzierte Hemmung der DNA-Synthese in Vergleichsuntersuchungen keine erkennbaren *DNA-over-replications* ausgelöst hatte.

Schlußfolgerungen und Ausblick

Die vorliegenden Versuche sind durch die relative Resistenz des Hühnerembryos gegenüber ionisierenden Strahlen gekennzeichnet. Selbst eine akute Strahlendosis von 8 Gy konnte die semikonservative DNA-Synthese nur für kurze Zeit hemmen. Die gleiche Strahlendosis, allerdings fraktioniert, zeigte überhaupt keine Wirkung.

Die in vivo-Interaktion von Hemmstoffen der DNA-Synthese und Röntgenbestrahlung verweist auf das mögliche Vorhandensein eines wirksamen subzellulären Reparatursystems, an dem insbesondere die DNA Polymerase β beteiligt zu sein scheint. Einen weiteren bemerkenswerten Befund stellt die Stimulation

der SDS und UDS nach Applikation von araC in vivo dar. Vor allem die noch 24 h nach Röntgenbestrahlung nachweisbare Stimulation der UDS sowie analoge Befunde der Literatur legen die Annahme einer Überproduktion von DNA nahe, die über eine Vermehrung von Ribonukleotidreduktase-Genen die relative Hydroxyharnstoffresistenz bedingen könnte.

Zur weiteren Aufklärung der beobachteten Effekte bieten sich folgende Untersuchungen an:

1. Direkte Messung der Aktivität der DNA Polymerase β in den Hepatozyten 0 - 24 h nach Röntgenbestrahlung.
2. Direkte Erfassung der Strahlenschäden an der DNA und der subzellulären DNA-Reparaturkapazität mit anderen Methoden als der Nukleoidsedimentation (z.B. alkalische Elution).
3. Überprüfung zellulärer Phänomene mittels Histologie und Autoradiographie.
4. Untersuchung auf araC-induzierte Gen-Amplifikation und
5. Direkte Messung der Ribonukleotidreduktase-Aktivität nach araC-Applikation bzw. Röntgenbestrahlung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß verschiedener Agenzien auf die semikonservative (SDS) und unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) von Hepatozyten des 15 Tage alten Hühnerembryos wurde *in vitro* und *in vivo* über den ^3H -Thymidin (^3H -dT)-Einbau in die säurefällbare Zell-Fraktion gemessen. Zur strahlenbiologischen und toxikologischen Charakterisierung der Hepatozyten wurden die Zellen *in vitro* Röntgenstrahlen, UV-Licht, Hydroxyharnstoff (HU), Methansulfonsäuremethylester (MMS), 1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (araC), 2',3'-Dideoxythymidin (ddT), 3-Aminobenzamid (3-AB), Ethidiumbromid (EB), Novobiocin und Hyperthermie ausgesetzt. Als wesentlichste Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen ergaben sich dabei eine relative Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber HU sowie eine ausgeprägte Empfindlichkeit auf EB und UV-Licht.

In vivo wurde die Wirkung von Röntgenbestrahlung (0, 3, 6, 12, 24 und 48 h vor der Aufarbeitung bei einmaligen Oberflächendosen von 0,25, 1, 4 und 8 Gy) sowie MMS, araC, ddT und 3-AB (Applikation jeweils 3 bzw. 24 h vor der Aufarbeitung) getestet. Über die *in vivo*-Interaktion zwischen den DNA-Synthesehemmstoffen araC, ddT und 3-AB einerseits und Röntgenbestrahlung andererseits sollte das Reparaturverhalten der Zellen näher untersucht werden. Die wesentlichsten *in vivo*-Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der semikonservative ³H-dT-Einbau wurde 3 h nach einer akuten Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy am stärksten gehemmt (28,4 %), während die ³H-dT-Einbaurrate 24 h nach Exposition nahezu ausgeglichen war.
24 h nach einer akuten Bestrahlungsdosis von 8 Gy war die UDS um das Doppelte erhöht (204,8 %) und *in vitro* nicht durch ddT und araC hemmbar.
Fraktionierte Röntgenbestrahlung (an 4 aufeinander folgenden Tagen je 2 Gy, insgesamt 8 Gy) zeigte 3 und 24 h nach der letzten Fraktion keinen Einfluß auf die SDS und UDS.
2. Nach Applikation des DNA-Polymerase β -Hemmstoffs ddT (22 μ g/ml Eivolumen) und anschließender Röntgenbestrahlung (8 Gy) war der 24 h später gemessene semikonservative ³H-dT-Einbau in die DNA um etwa 40 % gehemmt. Verglichen damit hatte die Interaktion von araC (1 μ g/ml Eivolumen) und Röntgenbestrahlung einen deutlich geringeren Einfluß auf die SDS. 3-AB (0,1 mMol/l Eivolumen) und Röntgenbestrahlung hatten eine leichte Stimulation der SDS zur Folge.
3. araC allein (1 μ g/ml Eivolumen) bewirkte 24 h nach Applikation eine etwa 60 %ige Stimulierung der SDS (162,5 %). Gleichzeitig induzierte araC eine Stimulation der UDS um mehr als das Zweifache (228,9 %), die *in vitro* ebenfalls nicht durch ddT und araC hemmbar war.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß Hepatozyten des Hühnerembryos Strahlenschäden an der DNA besonders wirkungsvoll reparieren, wobei insbesondere die DNA-Polymerase β von Bedeutung zu sein scheint. Die unter araC-Einfluß beobachtete Stimulierung sowohl der SDS als auch der UDS verweist auf die Möglichkeit einer unkontrollierten DNA-Überproduktion mit Vermehrung von Ribonukleotidreduktase-Genen, die die relative Hydroxyharnstoffresistenz erklären könnte.

SUMMARY

Deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis
in chick embryo hepatocytes under the influence of
DNA inhibitors and X-irradiation

The effect of various agents on scheduled (SDS) and unscheduled (UDS) deoxyribonucleic acid synthesis was tested *in vitro* and *in vivo* using hepatocytes of 15-day-old chick embryos by the incorporation of ^3H -thymidine (^3H -dT) into DNA.

Investigations were conducted *in vitro* to determine the radiobiological and toxicological characteristics of x-rays, uv-irradiation, hydroxyurea (HU), methyl methanesulfonate (MMS), 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (araC), 2',3'-dideoxythymidine (ddT), 3-aminobenzamide (3-AB), ethidiumbromide (EB) novobiocin and hyperthermia. The most important *in vitro*-results were the insensitiveness of the hepatocytes to

HU and the sensitiveness to EB and uv-irradiation.

In vivo, the effects of 0.25, 1, 4 or 8 Gray were tested at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after x-irradiation. The effects of treatment with either MMS, araC, ddT or 3-AB were investigated by injecting the compounds into the air chamber 3 or 24 hours before measurement of DNA synthesis. The repair of the hepatocytes was investigated by the interaction of inhibitors of repair DNA synthesis, i.e. araC (1 µg/ml egg volume), ddT (22 µg/ml egg volume) and 3-AB (0.1 mMol/l egg volume), with x-irradiation.

The *in vivo* results may be summarized as follows:

1. The greatest inhibition of SDS was seen 3 hours after irradiation with a single dose of 8 Gy (28.4 %), but 24 hours after irradiation SDS was quite normal. 8 Gy induced 24 hours later a stimulation of UDS, which was twice that of the controls (204.8 %). This stimulation of UDS was not inhibited *in vitro* by ddT or araC.

By fractionating x-irradiation, i.e. 2 Gy on 4 following days (total 8 Gy), there were no effects on SDS and UDS 3 and 24 hours after the last dose.

2. The interaction of the DNA polymerase β inhibitor, ddT, with x-irradiation (8 Gy) resulted in a significant inhibition of SDS (42.1 %) 24 hours after irradiation.
3. Only araC (1 µg/ml egg volume) effected a stimulation of SDS (162.5 %) and UDS (228.9 %) 24 hours after injection. UDS was also not inhibited by ddT or araC *in vitro*.

The results suggest that chick embryo hepatocytes effectively repair DNA damage. That DNA polymerase β could have an important role in such repair mechanisms is indicated by the results obtained with ddT.

From the stimulation of SDS and UDS by araC *in vivo*, the conclusion may be drawn that araC effects DNA overreplication with amplification of ribonucleotide reductase-genes. This could possibly explain the insensitiveness to HU.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Adams, R.L.P., R.H. Burdon, A.M. Campbell, R.M.S. Smellie:
Davidson's The Biochemistry of the nucleic acids.
8. Auflage. London, Chapman & Hall (1976)
- 2 Andrae, U., H. Greim:
Induction of DNA repair replication by hydroxyurea
in human lymphoblastoid cells mediated by liver
microsomes and NADPH.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 50 - 58 (1979)
- 3 Averdunk, R.:
Der Einfluß verschiedener Ablösungsverfahren auf die
Permeabilität und den Stoffwechsel von permanenten Ge-
webekulturen.
Z. ges. exp. Med. 153, 51 - 58 (1970)
- 4 Bianchi, V., A. Zantedeschi, A.G. Levis:
The scintillometric evaluation of DNA repair can be
distorted by changes of thymidine pool radioactivity.
Chem.- Biol. Interactions 43, 17 - 31 (1983)
- 5 Caldarera, C.M., G. Moruzzi:
Polyamines and nucleic acid metabolism in the chick
embryo.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 171, 709 - 720 (1970)
- 6 Castellot, J., M. Miller, D. Lehtomaki, A. Pardee:
Comparison of DNA replication and repair enzymology
using permeabilized baby hamster kidney cells.
J. Biol. Chem. 254, 6904 - 6908 (1979)
- 7 Clapp, N.K.:
LD 50 (24 hours) observations in the chick embryo after
exposure to X-rays.
Radiat. Res. 22, 457 - 462 (1964)
- 8 Cleaver, J.E.:
Methods for studying excision repair of DNA damaged by
physical and chemical mutagens.
Handbook of mutagenicity test procedures, 19 - 48,
Amsterdam, New York, Oxford,
Elsevier Scientific Publishing Co. (1977)
- 9 Cleaver, E.:
Competition of excision repair patches in human cell
preparations: identification of a probable mode of
excision and resynthesis.
Carcinogenesis 5, 325 - 330 (1984)

- 10 Cleaver, J.E., W:F: Morgan:
3-Aminobenzamide, an inhibitor of poly(ADP-Ribose)Poly-
merase, is a stimulator, not an inhibitor, of DNA-
repair.
Exp. Cell. Res. 172, 258 - 264 (1987)
- 11 Collins, A., C.S. Downes, R.T. Johnson:
DNA-repair and its inhibition.
Oxford, Washington, IRL Press (1984)
- 12 Collins, A.:
Cellular responses to ionizing radiation: effects of
interrupting DNA repair with chemical agents.
Int. J. Radiat. Biol. 51, 971 - 983 (1987)
- 13 Collins, A.:
Estimates of the rate of ligation during excision
repair of ultraviolet-damaged DNA in mammalian cells.
Biochim. Biophys. Acta 908, 103 - 106 (1987)
- 14 Collins, A., D.J. Oates:
Hydroxyurea: effects on deoxyribonucleotide pool sizes
correlated with effects on DNA repair in mammalian
cells.
Eur. J. Biochem. 169, 299 - 305 (1987)
- 15 Cooper, T.G.:
Biochemische Arbeitsmethoden
Berlin, New York, Walter de Gruyter Verlag (1981)
- 16 De Sessa, J.M.:
Cell death and free radicals.
A mechanism for HU-teratogenesis.
Medical Hypotheses 5, 937 - 951 (1979)
- 17 Dryanovski, P., B. Todorov:
On the content of guanosine and uridine acid soluble
nucleotides in the liver of chicken embryos and
chickens treated with gamma rays.
Nucl. Sci. Abs. 32, Nr. 3795 (1975)
- 18 Ehling, G.:
Einfluß einer akuten Ganzkörperröntgenbestrahlung auf
die semikonservative und unprogrammierte (reparaturbe-
dingte) Desoxyribonukleinsäure-Synthese von Knochen-
markszellen der Ratte nach fraktionierter Vorbestrah-
lung - Ein Beitrag zur Strahlenhormesis.
Diss. med. vet. München (1987)
- 19 Eppenberger, H.M., R. v. Fellenberg, R. Richterich,
H. Aebi:
Die Ontogenese von zytoplasmatischen Enzymen beim
Hühnerembryo.
Enzymol. biol. clin. 2, 139 - 174 (1962/63)

- 20 Francis, A.A., R.D. Blevins, W.L. Carrier,
D.P. Smith, J.D. Regan:
Inhibition of DNA repair in ultraviolet-irradiated
human cells by hydroxyurea.
Biochim. Biophys. Acta 563, 385 - 392 (1979)
- 21 Friedberg, E.C.:
DNA repair.
New York, W.H. Freeman and Co. (1984)
- 22 Freeman, B.M.:
Development of the avian embryo.
London, Chapman & Hall (1974)
- 23 Gebhardt, D.O.E.:
The use of chick embryo in applied teratology.
Adv. Terat. 5, 97 - 111 (1972)
- 24 Goette, A.:
Einfluß einiger radioprotektiver und radiosensibili-
sierender Verbindungen auf die semikonservative und
reparaturbedingte DNA-Synthese von Rattenmilzzellen
in vitro.
Diss. med. vet. München (1982)
- 25 Hahn, P., L.N. Kapp, W.F. Morgan, R.B. Painter:
Chromosomal changes without DNA overproduction in
Hydroxyurea-treated mammalian cells: implications for
gene amplification.
Cancer Res. 46, 4607 - 4612 (1986)
- 26 Hamilton, J.W., S.E. Bloom:
Correlation between mixed-function oxidase enzyme in-
duction and aflatoxin B 1-induced unscheduled DNA-
synthesis in the chick embryo in vivo.
Environ. Mutagen. 6, 41 - 48 (1984)
- 27 Hamilton, J.W., S.E. Bloom:
Correlation between induction of xenobiotic metabolism
and DNA damage from chemical carcinogens in the chick
embryo in vivo.
Carcinogenesis 7, 1101 - 1106 (1986)
- 28 Hamilton J.W., K.E. Wetterhahn:
Chromium(VI)-induced DNA damage in chick embryo liver
and blood cells in vivo.
Carcinogenesis 7, 2085 - 2088 (1986)
- 29 Harbers, E.:
Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen.
2. Auflage. Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1975)

- 30 Heinzelmann, R.:
Sedimentation von Nucleociden aus Thymus- und Milzzellen
der Ratte nach Röntgenbestrahlung in vitro und in vivo.
Diss. med. vet. München (1987)
- 31 Hilfer, S.R., J.M. Brown:
Collagenase. Its effectiveness as a dispersing agent
for embryonic chick thyroid and heart.
Exp. Cell Res. 65, 246 - 249 (1971)
- 32 Hochmann, J.:
Utilization of hydroxyurea for detection of DNA repair
synthesis in liver following dimethylnitrosamine action
by means of scintillation counting.
Fol. Biol. 33, 341 - 355 (1987)
- 33 Hollatz, R., K. Tempel:
Unscheduled DNA-Synthesis in UV-irradiated spleen
lymphocytes of the rat after whole-body X-irradiation.
Rad. Environm. Biophys. 15, 77 - 83 (1978)
- 34 Ishiguro, T., F. Otsuka, T. Ochi, M. Ohsawa:
Involvement of DNA polymerases in the repair
of DNA damage by benzo(a)pyrene in cultured
Chinese Hamster cells.
Mutat. Res. 57 - 63 (1987)
- 35 Jelinek, R.:
Use of chick embryo in screening for embryotoxicity.
Terat. Carcin. Mutag. 2, 255 - 261 (1982)
- 36 Jovanovic, M.M., Z.A. Knezevic, N.B. Svecenski:
Effect of Co-60-gamma rays on the nucleic acids content
and DN-ase II activity in the liver and spleen of chick
embryo.
Bull. Boris Kidrich Inst. Nucl. Sci. 13, 43 - 47 (1962)
- 37 Jungermann, K., H. Möhler:
Biochemie.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag (1980)
- 38 Karnofsky, D.A., C.R. Lacon:
The effects of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine on the
developing chick embryo.
Biochem. Pharmacol. 15, 1435 - 1442 (1966)
- 39 Kemper, F.H., N.P. Luepke:
Toxicity testing by the hens's egg test (HET).
Fd. Chem. Toxicol. 24, 647 - 648 (1986)

- 40 Khakimov, P.A., L.A. Murtazaeva, N.Kh. Shadieva:
Cytofluorometric analysis of DNA and DNP of hypophyseal
cells after exposure of chicken embryos to low doses of
ionizing radiation.
Radiobiologiya 21, 269 - 273 (1981)
- 41 Kondo, S.:
Altruistic cell suicide in relation
to radiation hormesis.
Int. J. Radiat. Biol. 53, 95 - 102 (1988)
- 42 Kucera, P., M.-B. Burnand:
Routine teratogenicity test that uses
chick embryos in vitro.
Terat. Carcin. Mutag. 7, 427 - 447 (1987)
- 43 Künzel, E.:
Die Entwicklung des Hühnchens im Ei.
Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey (1962)
- 44 Kuzin, A.M., P.A. Hakimov, R.T. Shaikhov, D.H. Hamidov:
Action of radiation given prior to and in the process
of incubation on the growth and development of embryos
and chickens and oviparity of hens.
Radiobiologiya 15, 866 - 870 (1975)
- 45 Laskowski, W.:
Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur.
Berlin, New York, Walter de Gruyter Verlag (1981)
- 46 Lavik, P.S.:
Incorporation of formate-C14 into purines and pyrimi-
dines of RNA and DNA in normal and X-irradiated chick
embryos.
Fed. Proc. 12, 236 - 243 (1953)
- 47 Liebecq-Hutter, S., C. Denoel, M.L. Beaumariage:
Incorporation de thymidine tritiée dans des fibro-
blastes et myoblastes d'embryon de poulet synchrones
et irradiés pendant les différentes phases
du cycle cellulaire.
Arch. Biol. 80, 139 - 151 (1969)
- 48 Lücke-Huhle, C., M. Pech, P. Herrlich:
Selective gene amplification in mammalian cells after
exposure to (60)Co gamma rays, (241)Am alpha particles,
or UV-light.
Radat. Res. 106, 345 - 355 (1986)
- 49 Lüpke, N.P.:
Hühner-Ei-Test (HET) - Ein pharmakologisch-toxikologi-
sches Experimentalmodell.
Ärztl. Kosmetol. 17, 13 - 30 (1987)

- 50 Mayr, A.:
Virologische Arbeitsmethoden.
Band I. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag (1974)
- 51 Mazhar, F.M., H.M. Roushdy:
Development of chick embryo in gamma irradiated eggs of
gallus domesticus.
INIS Atomindex 8, Nr. 332418 (1977)
- 52 Miller, M.R., D.M. Chinault:
Evidence that DNA polymerase α and β participate
differentially in DNA repair synthesis induced by
different agents.
J. Biol. Chem. 257, 46 - 49 (1982)
- 53 Miura, T., S. Nagai:
Effects of X-irradiation on nucleic acid content in
chick embryos.
Med. J. Osaka Univ. 8, 55 - 58 (1957)
- 54 Morgan, W.F., J. Bodycote, M.L. Fero, P.J. Hahn,
L.N. Kapp, G.E. Pantelias, R.B. Painter:
A cytogenetic investigation of DNA rereplication after
hydroxyurea treatment: implications for gene ampli-
fication.
Chromosoma 93, 191 - 196 (1986)
- 55 Morita, T., Y. Tsutsui, Y. Nishiyama, H. Nakamura,
S. Yoshida:
Effects of DNA polymerase inhibitors on replicative
and repair DNA synthesis in ultraviolet-irradiated
HeLa cells.
Int. J. Radiat. Biol. 42, 471 - 480 (1982)
- 56 Müller-Buder, A.:
Untersuchungen über die Wirkung einer Co60-Bestrahlung
auf das Schlupfergebnis von Hühnerbruteiern.
Diss. med. vet. Hannover (1981)
- 57 Novikoff, A.B., V.R. Potter:
Changes in nucleic acid concentration during the
development of the chick embryo.
J. Biol. Chem. 173, 233 - 238 (1948)
- 58 Painter, R.B., B.R. Young, L.N. Kapp:
Absence of DNA overreplication in Chinese hamster cells
incubated with inhibitors of DNA-synthesis.
Cancer Res. 47, 5595 - 5599 (1987)
- 59 Park, S.D., S.H. Lee, S.Y. Choe, D.B. Ha:
Effects of ultraviolet light on DNA replication and
repair in cultured myoblast cells of chick embryo.
Tongmul Hakhoe Chi 25, 55 - 62 (1982) *

- 60 Paterson, M.C., P.H.M. Lohman, E.A. De Weerd-Kastelein, A. Westerveld:
Photoreaction and excision repair of ultraviolet radiation-injured DNA in primary embryonic chick cells. *Biophys. J.* 14, 454 - 466 (1974)
- 61 Paul, J.:
Cell and tissue culture.
5. Aufl. Edinburgh, Churchill Livingstone Verlag (1975)
- 62 Petrovic, J., D.T. Kanazir:
Effect of x-irradiation on the basal and substrate-induced level of tryptophan oxygenase and the biosynthesis of nucleic acids in the liver of chicken embryos.
Strahlentherapie 143, 454 - 462 (1972)
- 63 Phillips, L.J., J.E. Coggle:
The radiosensitivity of embryos of domestic chickens and black-headed gulls.
Int. J. Radiat. Biol. 53, 309 - 317 (1988)
- 64 Rajewski, M.F., D.F. Hülser, E. Fabricius:
Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxycarbonsäure in normalen und malignen Säugerzellsystemen.
Z. Krebsforsch. 76, 266 - 292 (1971)
- 65 Reichard, P.:
From Deoxynucleotides to DNA synthesis.
Fed. Proc. 37, 9 - 14 (1978)
- 66 Romanoff, A.L., Romanoff, A.J.:
The avian egg.
London, Chapman & Hall (1949)
- 67 Romanoff, A.L.:
The avian embryo.
New York, McMillan Co. (1960)
- 68 Romanoff, A.L.:
Biochemistry of the avian embryo. A quantitative analysis of prenatal development.
New York, London, Sydney, John Wiley & Sons (1967)
- 69 Roza, L., M.H. Wade, G.H. van der Schans, P.H. Lohman, F. Berends:
Kinetics of unscheduled DNA synthesis in UV-irradiated chicken embryo fibroblasts.
Mutat. Res. 146, 305 - 310 (1985)

- 70 Schowing, J.:
Chick embryo as experimental material for teratogenic investigations.
Concepts Toxicol. 3, 58 - 73 (1985)
- 71 Seki, S., N. Hosogi, T. Oda:
Participation of DNA polymerase α and β in unscheduled DNA synthesis in mammalian cells.
Acta Med. Okayama 37, 213 - 225 (1983)
- 72 Shimabayashi, Y., K. Iwamoto:
Biochemical studies during the development of the chick embryo.
Agr. Biol. Chem. 28, 286 - 225 (1964)
- 73 Shrivastaw, K.P., K. Subba Rao:
Changes in the levels of DNA, RNA, protein and DNases in developing and old chick brain.
J. Neurochem. 25, 861 - 865 (1975)
- 74 Sinclair, W.K.:
Hydroxyurea revisited: A decade of clinical effects studies.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7, 631 - 637 (1981)
- 75 Snyder, R.D.:
Evaluation of putative inhibitors of DNA excision repair in cultured human cells by the rapid nick translation assay.
Mutat. Res. 173, 279 - 286 (1986)
- 76 Spath, A.:
Semikonservative und unprogrammierte (reparaturbedingte) Desoxyribonucleinsäuresynthese in Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte unter dem Einfluß von Diäthylthiocarbamat (DDC).
Diss. med. vet. München (1985)
- 77 Stearner, S.P., M.H. Sanderson:
Mechanisms of acute injury in the gamma-irradiated chicken: effects of a protracted or a split-dose exposure on the fine structure of the microvasculature.
Radiat. Res. 49, 328 - 350 (1972)
- 78 Stefani, M., L. Dalpra, G. Zei, R. Giorgi, A. Falaschi, F. Nuozzo:
Incorporation of (3H)thymidine stimulated by ultra-violet radiation into human fibroblast cultures.
Mutat. Res. 34, 313 - 326 (1976)
- 79 Stevens, K.M.:
Relation of uptake of radiophosphorus into nucleic acids to age of developing chick embryos.
Cancer Res. 12, 62 - 64 (1952)

- 80 Tempel, K.:
DNA-Reparaturkapazität von Hepatozyten des Hühner-
embryos während der Entwicklung.
Zbl. Vet. Med. A 27, 251 - 254 (1980)
- 81 Tempel, K., M. Wulffius-Kock, J. Winkle, I. Schmerold:
Semikonservative und reparaturbedingte Desoxyribo-
nukleinsäuresynthese in Rattenthymozyten unter dem Ein-
fluß einiger radioprotektiver und radiosensibilisierenden
Verbindungen.
Strahlentherapie 158, 112 - 122 (1982)
- 82 Tempel, K., I. Schmerold, W. Pfahler, A. Goette:
Vergleichende Untersuchungen zur DNA-Synthese von
Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro unter dem
Einfluß von Röntgenstrahlen, UV-Licht und radiomime-
tisch wirksamen Verbindungen.
Strahlentherapie 160, 386 - 393 (1984)
- 83 Tempel, K.:
DNA-Reparaturvorgänge in Thymus- und Milzzellen der
Ratte in vitro unter dem Einfluß des Poly(ADP-ribose)-
Polymerase-Hemmstoffs 3-Aminobenzamid.
Zbl. Vet. Med. A 32, 123 - 134 (1985)
- 84 Treton, J.A., S.P. Modak, P. Sohan, Y. Courtois:
Analysis of thymidine incorporation in the DNA of
chick embryonic lens epithelium and fibers irradiated
with ultraviolet light.
Exp. Eye Res. 32, 61 - 67 (1981) *
- 85 Tsikina, N.V.:
Content of nucleic acids and nucleotide composition
of the organs of chicks exposed to small doses of X-ray
irradiation.
Sb. Rab. - Leningr. Vet. Inst. 49, 33 - 36 (1977) *
- 86 Todorov, B.:
The effect of stimulation levels of ionizing radiation
on the stability of liver cell mitochondria in chick
embryos and young chickens.
Vet.-Med. Nauki 13, 37 - 41 (1976) *
- 87 Todorov, B.:
Studies on adenine acid-soluble nucleotides content in
the liver of gamma-irradiated chicken embryos.
Dokl. Bolg. Akad. Nauk 31, 347 - 348 (1978) *

* EDV-gestützte Literaturrecherche,
Universitätsbibliothek München.

- 88 Tuichiyev, S., P.A. Hakimov, D.H. Hamidov:
Action of ionizing radiation on the thyroid gland of
chick embryos.
Radiobiologiya 15, 398 - 401 (1975)
- 89 Tyrsted, G.:
Effect of hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine on
deoxyribonucleoside triphosphate pools early in phyto-
hemagglutinin-stimulated human lymphocytes.
Biochem. Pharmacol. 31, 3107 - 3113 (1982)
- 90 Ward, J.F., E.J. Joner, W.F. Blakely:
Effects of inhibitors of DNA strand break repair on
Hela cells radiosensitivity.
Cancer Res. 44, 59 - 63 (1984)
- 91 Wendt, E.:
Über die Wirkung von Röntgenstrahlen
auf Hühnerembryonen.
Arch. Geflügelk. 45, 85 - 92 (1981)
- 92 Weniger, P.:
Eine Methode zum Nachweis von geringen Strahlenschäden
in der DNA von eukariotischen Zellen.
Österr. Studienges. Atomenergie Ber. Nr 2990 (1978)
- 93 Weniger, P.:
Nucleoid sedimentation as a test system for DNA repair
after different types of DNA-damage.
Mutat. Res. 4, 261 - 265 (1982)
- 94 Woodcock, D.M., I.A. Cooper:
Aberrant double replication of segments of chromosomal
DNA following DNA synthesis inhibition by cytosine
arabinoside.
Exp. Cell Res. 123, 157 - 166 (1979)
- 95 Woodcock, D.M., I.A. Cooper:
Evidence for double replication of chromosomal DNA
segments as a general consequence of DNA replication
inhibition.
Cancer Res. 41, 2483 - 2490 (1981)
- 96 Woodcock, D.M., P.J. Crowther, G.A. u. I.A Cooper:
Aberrant replication of chromosomal DNA-segments in CHO
cells as a manifestation of a DNA repair system.
Exp. Cell Res. 147, 183 - 193 (1983)
- 97 Wright, J.A., T.G. Alam, G.A. McClarty, A.Y. Tagger,
L. Thelander:
Altered expression of ribonucleotide reductase and role
of M 2 gene amplification in hydroxyurea-resistant
hamster, mouse, rat, and human cell lines.
Som. Cell Mol. Gen. 13, 155 - 165 (1987)

- 98 Wyllie, A.H.:
Apoptosis: Cell death under homeostatic control.
Arch. Toxicol. 11, 3 - 10 (1987)
 - 99 Zöller, W.W.:
Untersuchungen über die Reaktion des Embryos auf Be-
strahlungen extraembryonaler Regionen des Hühnereies
(Distanzeffekt).
Strahlentherapie 129, 123 - 138 (1966)
- Nachtrag:
- 100 Bianchi, V.:
Effects of hydroxyurea on deoxyribonucleotide pools
of mouse fibroblasts.
Genetic Tox. Environm. Chem., Part A, 533 - 539 (1986)
 - 101 Cory, J.G., A. Sato:
Regulation of ribonucleotide reductase activity
in mammalian cells.
Mol. Cell. Biochem. 53/54, 257 - 266 (1983)
 - 102 Katz, E.J., M.A. Sirover:
DNA nucleotide excision-repair synthesis is
independent of perturbations of deoxynucleoside
triphosphate pool size.
Mutat. Res. 183, 249 - 256 (1987)
 - 103 Lagergren, J., P. Reichard:
Purine deoxyribonucleosides counteract effects
of hydroxyurea on deoxyribonucleoside triphosphate
pools and DNA synthesis.
Biochem. Pharmacol. 36, 2985 - 2991 (1987)
 - 104 Leeds, J.M., M.B. Slabaugh, C.K. Matheus:
DNA precursor pools and ribonucleotide reductase
activity: Distribution between the nucleus and
cytoplasm of mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. 5, 3443 - 3450 (1985)
 - 105 Reichard, P.:
Regulation of deoxyribotide synthesis.
Biochemistry 26, 3245 - 3248 (1987).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tempel
für die Überlassung des Themas und für die
jederzeit gewährte fürsorgliche Betreuung bei
der Anfertigung der vorliegenden Arbeit

Lebenslauf

Am 29. September 1960 wurde ich, Ingo Stammberger, als zweiter Sohn des Postbeamten Willi Stammberger und seiner Ehefrau Gisela, geb. Hoffmann, in Coburg geboren.

Von 1966 bis 1970 besuchte ich die Volksschule in Rodach bei Coburg, ehe ich im September 1970 an das Gymnasium Ernestinum in Coburg überwechselte. Nachdem ich am 27. Juni 1979 dort die Abiturprüfung bestanden hatte, wurde ich am 2. Juli 1979 zur Ableistung des Grundwehrdienstes einberufen.

Nach meiner Entlassung nahm ich im Wintersemester 1980 das Studium der Diplom-Geographie an der Universität Bayreuth auf. Zu Beginn des Wintersemesters 1981 wechselte ich zum Studium der Tiermedizin an die Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich am 18. November 1986 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 2. Januar 1987. Im Dezember 1986 begann ich meine Dissertation am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Seit 15. Juli 1987 bin ich dort als vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

